

**SARA ALEXANDRA DUARTE DOS SANTOS**

**TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE CANINA  
COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS  
ALOGÉNICO**

**Orientador:** Professor Doutor João Filipe Requicha  
**Co-orientadora:** Mestre Ângela Martins

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2017**

**SARA ALEXANDRA DUARTE DOS SANTOS**

**TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE CANINA  
COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS  
ALOGÉNICO**

Dissertação defendida em provas publicas para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, no dia 27 de junho de 2017, perante o Juri nomeado pelo Despacho Reitoral nº 212/2017, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professor Doutor Pedro Carvalho (Vasco da Gama)

Orientador: Professor Doutor João Requicha

Vogal: Professora Doutora Raquel Matos

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2017**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais,  
sem eles não poderia ter sido possível.

## Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, na pessoa da sua Directora, Prof.<sup>a</sup> Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado.

Quero agradecer à minha família, por toda a paciência, confiança, apoio e carinho que sempre me deram ao longo de toda a minha vida, inclusive académica. Um agradecimento especial aos meus pais por sempre acreditarem em mim e fazerem de mim quem eu sou, este momento nunca seria possível sem eles.

À Mestre Ângela Martins por toda a inspiração, motivação e conhecimento que me transmitiu na área da Medicina da Reabilitação, e também o apoio e orientação ao longo de todos estes meses na elaboração da minha Dissertação.

Ao Prof. Doutor João Requicha por toda a paciência, apoio, dedicação, orientação e disponibilidade que demonstrou ao longo de toda esta Dissertação.

Queria agradecer também a toda a equipa médica/estagiários do Hospital Veterinário Central (Charneca da Caparica) por me terem acolhido e ajudado a crescer não só como pessoa, mas também como futura profissional.

Por fim, queria agradecer à Wylie Veterinary Center (Upminster, Inglaterra) pelos cinco meses incríveis de pura dedicação, amor e conhecimento.

Um especial agradecimento à Dr.<sup>a</sup> Kaidian, Dr.<sup>a</sup> Lizzie, Dr. Airon, Dr. Julius, Dr. Morkel, Dr. Richard.

Aos meus colegas de estágio tanto em Portugal como em Inglaterra, esta jornada não seria a mesma sem vocês.

Às minhas grandes amigas/amigos e colegas de faculdade, Joana Alcazar, Sarah Ottavi, Mariana Pacheco, Telmo Santos e João Batista por toda a amizade e partilha. Serão sempre parte de mim.

A todos os meus amigos, os verdadeiros amigos dos quais não é necessário citar nomes, por fazerem parte da minha vida e por acreditarem em mim.

Agradeço a todos do fundo do meu coração. Muito obrigada.

## Resumo

A osteoartrite (OA) é a forma mais comum de artrite e a principal causa de dor crónica em cães. A elevada incidência e morbilidade desta doença justifica o interesse pelo estudo dos seus mecanismos desencadeadores e fisiopatológicos de forma a desenvolver tratamentos cada vez mais eficazes e individualizados, bem como de novas estratégias profiláticas.

O plasma rico em plaquetas (PRP) consiste numa suspensão de sangue centrifugado contendo uma elevada concentração de plaquetas. Quando utilizado, aumenta e acelera os efeitos de factores de crescimento e de diferenciação, contidos nas plaquetas, na regeneração de tecidos. O PRP é utilizado na OA de forma a estimular a regeneração da cartilagem articular com vista a permitir ao cão uma locomoção sem claudicação e sem dor num determinado período de tempo.

No presente trabalho teve como objectivo avaliar o efeito do PRP na terapia de osteoartrite, recorrendo a uma abordagem alogénica. A população estudada foi composta por cinco cães de diferentes raças, entre os 6 e os 12 anos, 3 machos e 2 fêmeas, atendidos no Hospital Veterinário da Arrábida, em Azeitão (Portugal), no ano de 2015. Todos os cães apresentavam OA e foram tratados com PRP obtido de forma alogénica a partir de sangue recolhido dos mesmos animais e posteriormente processado em conjunto. O PRP foi aplicado por via intra-articular nas articulações afectadas e os animais foram acompanhados aos 30, 60 e após 90 dias.

Esta modalidade terapêutica mostrou ser segura e obteve resultados positivos em todos os animais do estudo para o tratamento da osteoartrite. Todos os animais do estudo apresentaram melhorias aos 30 e aos 60 dias após a aplicação do PRP, tanto no grau de claudicação como no grau de dor, tendo sido mais significativa após os 90 dias da mesma. É importante salientar que, o sucesso dos resultados na terapia com PRP parece ser evidente com OA iniciais.

O interesse do PRP tem vindo a aumentar em Medicina Veterinária, existindo ainda, poucas referências sobre o seu efeito na OA canina. Nesse sentido, será importante estudar a sua aplicação num maior número de cães, a fim de validar este procedimento como prática terapêutica na rotina clínica.

**Palavras-chave:** cão, osteoartrite, Medicina Regenerativa, plasma rico em plaquetas (PRP), dor, claudicação

## Abstract

Osteoarthritis is the most common form of arthritis and the number one cause of chronic pain in dogs. The increasing incidence and morbidity of this disease has made it a target for researchers to unveil its triggers and physiopathological mechanisms for a more individualized and efficient treatment as well as new profilactic strategies.

Platelet rich plasma (PRP) consists of a centrifuged blood suspension containing a high concentration of platelets. When used, it increases and accelerates the effects of growth factors and differentiation, contained in platelets, on tissue regeneration. The PRP is used in OA in order to stimulate the regeneration of articular othooa certain period of time.

In the present study, the central objective was to evaluate the effect of PRP on canine osteoarthritis (OA) therapy, using na allogenic approach. The studied population was composed of five dogs of different races, between 6 and 12 years old, 3 males and 2 females, attended at the Veterinary Hospital of Arrábida, Setúbal. All dogs presented OA and were treated with PRP with allogeneic PRP from blood collected from the same animals and then processed together.

The PRP was applied intra-articularly in the affected joints and the animals were followed at 30, 60 and after 90 days.

This therapeutic modality showed to be safe and obtained positive results in all the animals of the study for the treatment of canine osteoarthritis. All the animals in the study presented improvements at 30 and 60 days after PRP application, both in degree of lameness and pain degree, being more significant after the 90 days of the application.

It is important to note that the success of the results in PRP therapy appears to be evident with initial OA.

The interest of PRP has been increasing in Veterinary Medicine, and there are still few references to its effect on PRP therapy in canine osteoarthritis. In this sense, it would be important to have more studies and more cases in dogs, in order to validate this procedure as a therapeutic practice in the clinical routine.

**Key words:** dog, osteoarthritis, Regenerative Medicine, platelet rich plasma (PRP), pain, lameness

## Lista de Abreviaturas, Símbolos e Acrónimos

**ASCs** - Células estaminais derivadas do tecido adiposo (do Inglês, *Adipose derived stem cells*)

**AINE** - Anti-inflamatório não esteróide

**APT** - Ângulo do *plateau* tibial

**AROM** - Amplitude de movimento activo (do Inglês, *Active range of motion*)

**BMSCs** - Células estaminais derivadas da medula óssea

**DA** - Displasia de anca

**FCD** - Factores de crescimento e de diferenciação

**HVC** - Hospital Veterinário Central

**IA** – Via intra-articular

**IRAP** - Proteína antagonista do receptor da interleucina 1

**IV** - Via venosa

**LASER**- (do Inglês, *Light amplification by stimulated emission of radiation*)

**MSCs** - Células estaminais mesenquimatosas (do Inglês, *Mesenchymal stem cells*)

**OA** - Osteoartrite

**OCD** - Osteocondrite dissecante

**PROM** - Amplitude do movimento passivo (do Inglês, *Passive range of motion*)

**RM** - Ressonância magnética

**ROM** - Amplitude de movimento (do Inglês, *Range of motion*)

**PO** - Via oral (do Latim, *per os*)

**PRP** - Plasma rico em plaquetas

**SCs** - Células estaminais (do Inglês, *Stem cells*)

**SRD**- Sem raça definida

**TC** - Tomografia computadorizada

**TENS**- (do Inglês, *Transcutaneous electrical nerve stimulation*)

**TPLO** - Osteotomia de nivelamento da mesa tibial (do Inglês, *Tibial plateau leveling osteotomy*)

**TTA**- Avanço da tuberosidade da tibia (do Inglês, *Tibial tuberosity advancement*)

**WVC** - Wylie Veterinary Centre

# Índice Geral

|  |    |
|--|----|
| <b>Agradecimentos</b>  | 5  |
| <b>Resumo</b>  | 6  |
| <b>Abstract</b>  | 7  |
| <b>Lista de Abreviaturas, Símbolos e Acrónimos</b>                                       | 8  |
| <b>Índice Geral</b>  | 9  |
| <b>Índice de Figuras</b>   | 11 |
| <b>Índice de Tabelas</b>   | 13 |
| <b>I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR</b>  | 14 |
| 1. Consultas   | 16 |
| 2. Exames complementares de diagnóstico  | 17 |
| 3. Cirurgias   | 18 |
| <b>II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO</b>   | 19 |
| 1. INTRODUÇÃO  | 19 |
| 1.1. Medicina Regenerativa   | 19 |
| 1.2. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)  | 19 |
| 1.2.1. Obtenção e composição do PRP  | 21 |
| 1.2.2. Aplicação e segurança do PRP  | 24 |
| 1.3. Osteoartrite  | 25 |
| 1.3.1. Diagnóstico da osteoartrite   | 26 |
| 1.3.1.1. Avaliação imagiológica  | 27 |
| 1.3.2. Tratamento da osteoartrite  | 30 |
| 1.4. Tratamento da osteoartrite com abordagens de Medicina Regenerativa                  | 31 |
| 1.4.1. Plasma rico em plaquetas  | 31 |
| 1.4.2. Terapias celulares  | 33 |
| 1.4.3. Ácido hialurónico   | 34 |
| 1.4.4. Inibição da angiogénese   | 35 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS   | 36 |
| 2.1. População estudada  | 36 |
| 2.2. Abordagem terapêutica antes da terapia com PRP                                      | 36 |
| 2.2.1. Protocolo de modalidades terapêuticas de reabilitação utilizado no Animal 1       | 37 |
| 2.2.2. Protocolo de modalidades terapêuticas de reabilitação utilizado nos Animais 3 e 4 | 38 |
| 2.2.3. Protocolo de modalidades terapêuticas de reabilitação utilizado no Animal 5       | 41 |
| 2.3. Aplicação do PRP  | 42 |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.4. Parâmetros avaliados .....</b>               | <b>43</b> |
| <b>2.5. Análise estatística .....</b>                | <b>43</b> |
| <b>3.RESULTADOS .....</b>                            | <b>44</b> |
| <b>3.1 Caracterização da população estudada.....</b> | <b>44</b> |
| <b>3.2 Evolução clínica .....</b>                    | <b>45</b> |
| <b>4. DISCUSSÃO .....</b>                            | <b>47</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO .....</b>                            | <b>50</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>           | <b>51</b> |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Interação dos factores de crescimento e de diferenciação de citoquinas .....   | 19 |
| <b>Figura 2:</b> Separação do sangue em três camadas .....  | 20 |
| <b>Figura 3:</b> Imagem macroscópica do plasma rico em plaquetas .....  | 20 |
| <b>Figura 4:</b> Ilustração da articulação do joelho do cão com as alterações osteoartíticas que ocorrem ao longo do tempo .....                                      | 24 |
| <b>Figura 5:</b> Articulações passíveis de serem afectadas por osteoartrites em cães .....  | 25 |
| <b>Figura 6:</b> Características radiográficas da osteoartrite .....  | 26 |
| <b>Figura 7:</b> Tomografia computadorizada dos cotovelos de um cão com fragmentação do processo coronóide medial e alterações secundárias no cotovelo esquerdo ..... | 27 |
| <b>Figura 8:</b> Ressonância magnética: A, Cotovelo de um cão com osteoartrite. B e C, osteoartrite da articulação coxofemoral .....                                  | 29 |
| <b>Figura 9:</b> Esquema das etapas de tratamento da osteoartrite canina, segundo a gravidade da doença .....   | 29 |
| <b>Figura 10:</b> Imagem artroscópica de sinovite onde se observa uma massa tipo couve-flor característica do fenómeno angiogénico .....                              | 34 |
| <b>Figura 11:</b> Equipamento utilizado na terapia de ondas-choque extracorporeal .....   | 36 |
| <b>Figura 12:</b> Equipamento de terapia com laser classe IV .....  | 37 |
| <b>Figura 13:</b> Equipamento de terapia com electroestimulação .....   | 38 |
| <b>Figura 14:</b> Hidroterapia .....  | 39 |
| <b>Figura 15:</b> Terapia com diatermia .....   | 40 |

**Figura 16:** Injecção de PRP via intra-articular, após localização ecoguiada da  
cavidade articular

..... 41

**Figura 17:** Distribuição etária dos animais em estudo .....

43

**Figura 18:** Gráfico das raças dos animais em estudo .....

43

## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Distribuição dos animais observados em relação à espécie e ao sexo .....  | 14 |
| <b>Tabela 2:</b> Distribuição relativa das consultas observadas durante os dois estágios curriculares .....  | 15 |
| <b>Tabela 3:</b> Distribuição relativa das consultas de especialidade observadas por área de especialidade durante os dois estágios curriculares ..... | 15 |
| <b>Tabela 4:</b> Distribuição relativa das intervenções realizadas no âmbito das consultas de tratamento e reavaliação .....                           | 16 |
| <b>Tabela 5:</b> Distribuição relativa dos meios complementares de diagnóstico ou dos procedimentos de recolha de amostra observados .....             | 16 |
| <b>Tabela 6:</b> Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas realizadas durante os dois estágios curriculares .....                              | 17 |
| <b>Tabela 7:</b> Informação dos 5 cães estudados em relação à raça, idade e local da osteoartrite .....  | 35 |
| <b>Tabela 8:</b> Grau de claudicação e de dor no dia 0 .....   | 35 |
| <b>Tabela 9:</b> Protocolo do treino locomotor na passadeira aquática .....  | 40 |
| <b>Tabela 10:</b> Evolução do grau de claudicação após a administração de PRP nos casos clínicos em estudo .....                                       | 44 |
| <b>Tabela 11:</b> Evolução do grau de dor após a administração de PRP nos casos clínicos em estudo.....  | 45 |

## **I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR**

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, a aluna realizou dois estágios curriculares na área de Medicina e Cirurgia de Animais de Companhia. O primeiro teve lugar no Hospital Veterinário Central (HCV), na Charneca da Caparica, sob a orientação clínica do Dr. Nuno Paixão, durante o período compreendido entre 15 de Setembro de 2015 e 30 de Outubro de 2015. O segundo foi realizado na Wylie Veterinary Centre, em Inglaterra, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Lizzie Sinclair, durante o período compreendido entre 1 de Novembro de 2015 e 27 de Fevereiro de 2016.

A presente secção do trabalho tem como objectivo descrever de forma pormenorizada as actividades realizadas com vista ao desenvolvimento de competências na prática clínica e cirúrgica de animais de companhia, através da integração do conhecimento obtido durante os anos curriculares do curso.

No HCV, a aluna participou activamente nos principais serviços da clínica (consulta externa, internamento e cirurgia) num calendário de rotatividade semanal e executando o horário de cada serviço e horas extra no serviço de urgências.

Na rotação de consulta externa, a aluna foi convidada a assistir às consultas de medicina geral e de especialidade, podendo participar na contenção dos animais, na realização do exame de estado geral, na preparação e administração de medicação e na execução, sob supervisão, de exames complementares de diagnóstico. Estes incluíram análises hematológicas e de bioquímica sérica, exames serológicos de diagnóstico rápido, radiografias, eletrocardiografias e ecografias. Quando possível, conduziu as consultas e discussão de planos de vacinação e desparasitação em consultas de medicina preventiva, a remoção de suturas e o tratamento de feridas cirúrgicas bem como a comunicação aos proprietários dos cuidados pós-cirúrgicos.

No HCV, a aluna realizou rotações no serviço de internamento permanente incluindo turnos tanto de dia como de noite e nos fins-de-semana e feriados. Na WCV, a aluna realizou sempre o mesmo horário no período entre as 9h e as 17h, isto, é, no horário implementado para os estagiários estudantes na área de clínica. Contudo, na maioria dos dias realizou horas extras depois das 17h com o intuito de obter o máximo de conhecimento e experiência possível.

Em cada rotação no WCV, participou de forma activa em todas as tarefas do serviço, tais como a discussão dos casos clínicos com o Médico Veterinário de serviço, a preparação e administração da medicação e a monitorização de parâmetros

clínicos dos animais internados bem como dos cuidados básicos de higiene e de alimentação.

A aluna teve também sob responsabilidade o internamento dos animais precedentes da consulta externa, nomeadamente a cateterização, administração de medicação e fluidoterapia, acondicionamento na jaula e, quando solicitado, a realização de exames de diagnósticos complementares.

Com o avançar em ambos os estágios e o consequente aumento de prática, realizou de forma autónoma tarefas de crescente responsabilidade, sendo exemplos: a colocação de sondas esofágicas, a realização de cistocentese ecoguiada, a drenagem de efusões e a execução de protocolos de fisioterapia. No serviço de cirurgia, foi possível acompanhar cirurgias de tecidos moles e cirurgias ortopédicas, bem como de cirurgias menores.

No âmbito do serviço de cirurgia, assegurou o acompanhamento dos procedimentos, como também do seus períodos pré e pós-cirúrgicos. Durante a cirurgia, a aluna estagiária teve a oportunidade de participar como circulante, ajudante de cirurgião e anestesista, assumindo diversas vezes a função de cirurgião em intervenções simples, como a orquiectomia electiva em gatos e ajudante de cirurgião em cirurgias mais complexas, ortopédicas, oncológicas, oftalmológicas, de entre outras.

Além disso, foi-lhe solicitado que, sob supervisão, realizasse a preparação pré-cirúrgica da sala e do animal, incluindo a indução anestésica e a entubação endotraqueal do animal sujeito à intervenção cirúrgica.

Após a conclusão da cirurgia, a aluna participou no acompanhamento dos animais durante o período de recobro, monitorizando sinais clínicos vitais e administrando a medicação necessária, além de auxiliar na manutenção das condições de higiene e esterilidade da sala e dos instrumentos cirúrgicos.

# 1. Consultas

Durante o estágio, foi possível acompanhar diferentes tipos de consultas. A distribuição dos animais relativamente ao sexo e espécie encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1** – Distribuição relativa dos animais observados durante os dois estágios curriculares em relação à espécie e ao sexo.

| Estágio | Animais | FR  | Sexo  | Percentagem |
|---------|---------|-----|-------|-------------|
| HVC     | Cães    | 56% | Macho | 53%         |
|         |         |     | Fêmea | 47%         |
|         | Gatos   | 44% | Macho | 52%         |
|         |         |     | Fêmea | 48%         |
| WVC     | Cães    | 58% | Macho | 55%         |
|         |         |     | Fêmea | 45%         |
|         | Gatos   | 42% | Macho | 53%         |
|         |         |     | Fêmea | 47%         |

No decorrer do estágio, foi possível assistir aos diferentes tipos de consultas, que se dividiram em consultas de imunoprofilaxia, especialidade de medicina interna e de tratamentos e/ou reavaliações (Tabela 2). No

Sendo o HVC um hospital de referência de urgências, estas assumiram destaque, tendo sido contudo possível contactar com distintas especialidades médicas (Tabela 3).

**Tabela 2** – Distribuição relativa das consultas observadas durante os dois estágios curriculares.

| Estágio | Consultas               | Percentagem |
|---------|-------------------------|-------------|
| HVC     | Imunoprofilaxia         | 43%         |
|         | Medicina Interna        | 37%         |
|         | Tratamentos/Reavaliação | 20%         |
| WVC     | Imunoprofilaxia         | 39%         |
|         | Medicina Interna        | 28%         |
|         | Pré-cirúrgica           | 17%         |
|         | Tratamentos/Reavaliação | 16%         |

**Tabela 3** – Distribuição relativa das consultas observadas por área de especialidade durante os dois estágios curriculares.

| Estágio | Tipo de consulta      | Percentagem |
|---------|-----------------------|-------------|
| HVC     | Urgências             | 28%         |
|         | Dermatologia          | 14%         |
|         | Gastroenterologia     | 13%         |
|         | Urologia e Nefrologia | 12%         |
|         | Pneumologia           | 11%         |
|         | Oncologia             | 10%         |
|         | Ortopedia             | 8%          |
|         | Doenças infecciosas   | 2%          |

|            |                       |     |
|------------|-----------------------|-----|
| <b>WVC</b> | Reprodução            | 1%  |
|            | Outros                | 1%  |
|            | Gastroenterologia     | 25% |
|            | Urologia e Nefrologia | 18% |
|            | Dermatologia          | 16% |
|            | Pneumologia           | 13% |
|            | Oncologia             | 12% |
|            | Ortopedia             | 9%  |
|            | Doenças infecciosas   | 5%  |
|            | Reprodução            | 1%  |
|            | Outros                | 1%  |

As consultas de tratamento/reavaliação incluíram a revisão e/ou tratamento de animais após cirurgias, internamento ou consultas prévias a estes procedimentos. Nestas, era realizada a administração de medicação injetável ou oral, a remoção de pontos após cirurgia, a colocação ou remoção de pensos e atos de eutanásia, de entre outras tarefas (Tabela 4).

**Tabela 4** – Distribuição relativa das intervenções realizadas no âmbito das consultas de tratamento e de reavaliação.

| <b>Estágio</b> | <b>Tipo de intervenção</b> | <b>Percentagem</b> |
|----------------|----------------------------|--------------------|
| <b>HVC</b>     | Medicação injectável/oral  | 75%                |
|                | Remoção de pontos          | 16%                |
|                | Colocação/remoção penso    | 4%                 |
|                | Eutanásia                  | 3%                 |
|                | Outros                     | 1%                 |
| <b>WVC</b>     | Medicação injectável/oral  | 40%                |
|                | Remoção de pontos          | 34%                |
|                | Colocação/remoção penso    | 19%                |
|                | Eutanásia                  | 5%                 |
|                | Outros                     | 2%                 |

## 2. Exames complementares de diagnóstico

Durante o estágio, foi possível efetuar inúmeros exames e procedimentos complementares de diagnóstico, estando estes descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** – Distribuição relativa dos meios complementares de diagnóstico ou dos procedimentos de recolha de amostra observados.

| <b>Estágio</b> | <b>Exame</b>                      | <b>Percentagem</b> |
|----------------|-----------------------------------|--------------------|
| <b>HVC</b>     | Hemograma/ Bioquímicas sanguíneas | 26%                |
|                | Radiografia                       | 20%                |
|                | Ecografia abdominal               | 18%                |
|                | Ecocardiografia                   | 13%                |
|                | Electrocardiografia               | 8%                 |
|                | Punção aspirativa por agulha fina | 7%                 |



|            |                                      |     |
|------------|--------------------------------------|-----|
| <b>WVC</b> | Raspagem de pele                     | 5%  |
|            | Biopsia                              | 3%  |
|            | Hemograma/ Bioquímicas<br>sanguíneas | 22% |
|            | Radiografia                          | 17  |
|            | Ecografia abdominal                  | 13  |
|            | Ecocardiografia                      | 11  |
|            | Electrocardiografia                  | 9   |
|            | Punção aspirativa por agulha fina    | 8   |
|            | Raspagem de pele                     | 7   |
|            | Biopsia                              | 6   |
|            | Endoscopia                           | 4   |
|            | Broncoscopia                         | 3   |

### 3. Cirurgias

Na área de clínica cirúrgica, foram realizados diversos procedimentos, estando eles agrupados em dois grupos: cirurgia de tecidos moles e cirurgia ortopédica (Tabela 6).

**Tabela 6** – Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas realizadas durante os dois estágios curriculares.

| <b>Cirurgias</b> |                                  | <b>Percentagem</b>                   |
|------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| <b>HVC</b>       | Cirurgia de tecidos moles<br>80% | Aparelho reprodutor feminino 25%     |
|                  |                                  | Aparelho reprodutor masculino 21%    |
|                  |                                  | Aparelho gastrointestinal 17%        |
|                  |                                  | Aparelho urinário 9%                 |
|                  |                                  | Tratamento dentário 8%               |
|                  |                                  | Biópsia 7%                           |
|                  |                                  | Exérese de massa 5%                  |
|                  |                                  | Remoção de corpo estranho 4%         |
|                  |                                  | Resolução de hérnia diafragmática 3% |
|                  |                                  | Tiroidectomia 1%                     |
|                  |                                  | <i>Total</i> 100%                    |
|                  | Cirurgia ortopédica<br>20%       | Recessão da cabeça do fémur 55%      |
|                  |                                  | Resolução de fractura do fémur 34%   |
|                  |                                  | Resolução de hérnia lombar 11%       |
|                  |                                  | <i>Total</i> 100%                    |
| <b>WVC</b>       | Cirurgia de tecidos moles<br>80% | Esterilização 23%                    |
|                  |                                  | Exerece de massa 19%                 |
|                  |                                  | Cirurgia oftalmológica 16%           |
|                  |                                  | Cirurgia intracavitária 10%          |
|                  |                                  | Cirurgia nasal 8%                    |
|                  |                                  | Remoção de corpo estranho 7%         |
|                  |                                  | Mastocitomas 5%                      |
|                  |                                  | Hérnia umbilical 4%                  |

|     |                                |      |
|-----|--------------------------------|------|
|     | Hérnia perineal                | 3%   |
|     | Amputação da cauda             | 2%   |
|     | Falopexia                      | 2%   |
|     | Remoção da glândula anal       | 1%   |
|     | Facelifting                    | 1%   |
| 20% | Total                          | 100% |
|     | Resolução de fractura do fémur | 30%  |
|     | TPLO                           | 26%  |
|     | Substituição da anca           | 23%  |
|     | TTA                            | 21%  |
|     | Total                          | 100% |

## II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Medicina Regenerativa

Na última década, destacou-se um novo ramo da Medicina designado por Medicina Regenerativa. Esta área aplica os princípios das ciências da saúde, da biologia e da engenharia, com o intuito de obter substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem as funções de órgãos e de tecidos do organismo (Luna, 2007; Bajada *et al.*, 2008).

A Medicina Regenerativa em animais de companhia tem sido alvo, nos anos recentes, de uma rápida evolução. Novas terapias baseadas na aplicação de biomateriais, de células estaminais adultas, de plasma rico em plaquetas e outros factores de crescimento e de diferenciação estão agora disponíveis na prática clínica (Luna, 2007; Bajada *et al.*, 2008).

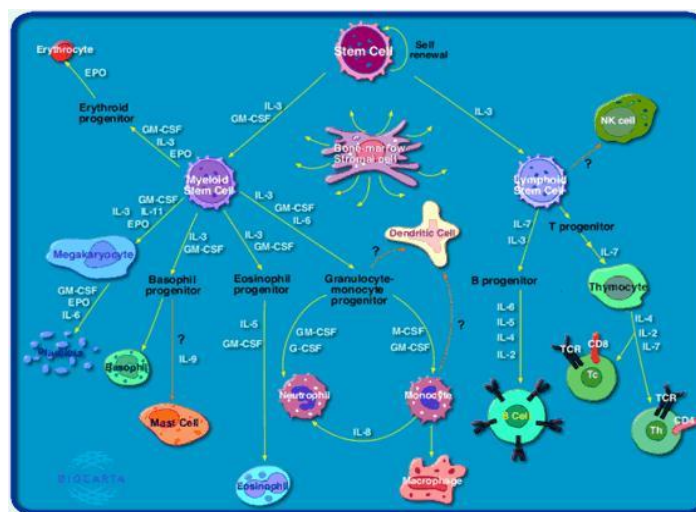
#### 1.2. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O PRP é um gel rico em factores de crescimento e de diferenciação (FCDs) libertados dos grânulos alfa armazenados no interior das plaquetas. Estes factores intervêm nos processos de mitose, quimiotaxia, diferenciação, crescimento das células mesenquimatosas indiferenciadas e produzem a matriz extracelular, contribuindo para promover a regeneração tecidual (La Mata, 2013, Viegas *et al.*, 2006).

As plaquetas desempenham um papel importante tanto na hemostase como na cicatrização de feridas, contêm grânulos que libertam factores de crescimento para

estimular outras células do corpo a migrarem para a área que sofreu traumatismo, facilitando, assim, a regeneração dos tecidos.

Os factores de crescimento que compõem o PRP incluem o factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o factor de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), o factor de crescimento transformante- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2), o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), o factor de crescimento de fibroblastos (bFGF) e o factor de crescimento epidérmico (EGF) (Figura 1).



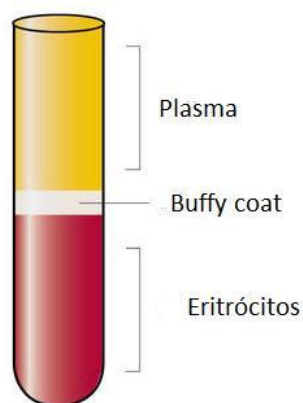
**Figura 1** - Interação dos factores de crescimento e de diferenciação e citocinas (adaptado de Wikesjö *et al.*, 1992)

O PRP é utilizado na regeneração de osso alveolar e maxilofacial (Aghalloo *et al.*, 2005; Nunes Filho *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008), em transplantes de córnea (Gimeno *et al.*, 2006), cicatrização de feridas em animais com *diabetes mellitus* (Driver *et al.*, 2006). O PRP tem, actualmente, aplicações clínicas muito mais amplas, estendendo-se à cirurgia ortopédica para regeneração óssea e à medicina desportiva no tratamento de tendinite e desmíte (Carr *et al.*, 2016).

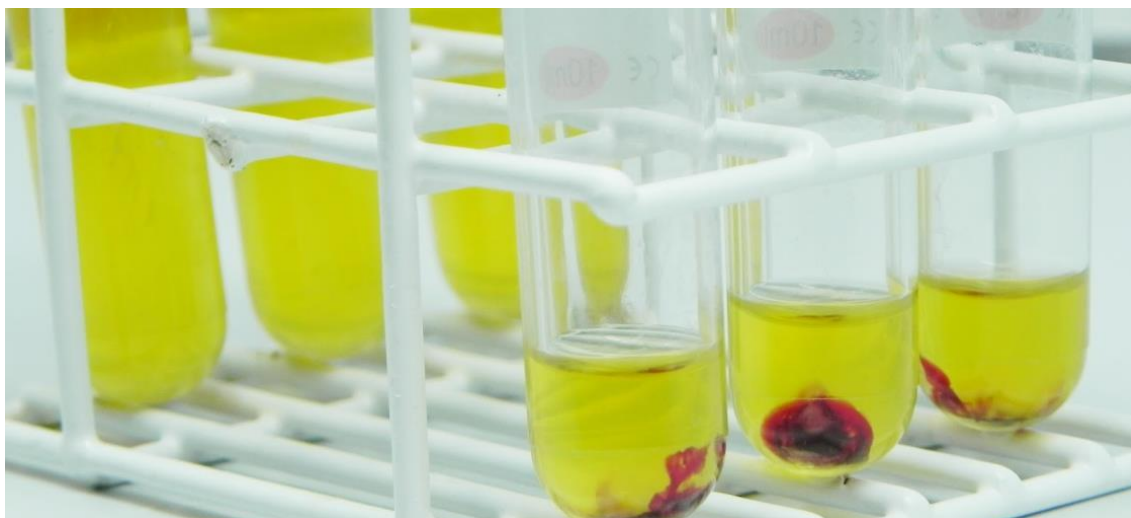
Vários estudos têm apoiado o uso de PRP na cicatrização dos tecidos moles. Um recente estudo, randomizado e controlado, demonstrou que os cães com tendinopatia patelar tratados com PRP tiveram maior função e menor dor do que os doentes no grupo de controlo (Carr *et al.*, 2016). Vários estudos documentaram a utilização de PRP para o tratamento da osteoartrite. Um recente estudo cego, randomizado e prospectivo, demonstrou que uma única dose de PRP é mais eficaz do que um placebo para o melhoramento da sua função em seres humanos com osteoartrite no joelho (Carr *et al.*, 2016).

### 1.2.1. Obtenção e composição do PRP

O PRP é obtido pela centrifugação do sangue total através do gradiente de densidade, obtendo-se uma grande concentração de plaquetas num pequeno volume de plasma (Marx *et al.*, 1998; Froum *et al.*, 2002; Freymiller; Aghaloo, 2004; Marx, 2004). No coágulo sanguíneo normal, 95% das células são eritrócitos, 5% são plaquetas e menos de 1% são leucócitos. No PRP, esse quociente entre eritrócitos e plaquetas é invertido (Barbosa *et al.*, 2008; Rossi Junior, 2001) (Figura 3).



**Figura 2** - Separação do sangue em três camadas. (adaptado de [www.bloodcenter.stanford.edu](http://www.bloodcenter.stanford.edu))



**Figura 3** – Imagem macroscópica do plasma rico em plaquetas (adaptado de Marx, 2004)

A concentração de plaquetas no PRP para fins terapêuticos deve ser significativamente maior que a concentração plasmática para proporcionar a libertação adequada de FCDs no local da aplicação (Pagliosa & Alves, 2007). Estudos recentes indicam que o PRP medeia a cicatrização através do fornecimento de factores de

crescimento, citocinas, quimiocinas e outros compostos bioactivos (Pagliosa & Alves, 2007).

Segundo Lemos e colaboradores (2002), o PRP adequado deve conter no mínimo 1.000.000 de plaquetas por micro-litro de plasma. Os factores limitantes para a utilização do procedimento são: presença de trombocitopenia ou de inviabilidade (lise celular) em que os FCD podem ser libertados antes do tempo (Marx, 2004; Barbosa *et al.*, 2008; Dusse *et al.*, 2008; Kasten *et al.*, 2008).

A preparação do PRP deve ser cuidadosa e de modo asséptico para evitar a contaminação. Para conseguir uma consistência melhor e facilitar a aplicação do gel, pode ser adicionado a iões cálcio, trombina autóloga bovina ou osso biparticionado usado como material osteocondutor (Dusse *et al.*, 2008).

O princípio do tratamento com PRP assenta na inversão do rácio eritrócitos/plaquetas (diminuindo o conteúdo de eritrócitos a 5% por serem menos importantes no processo de cicatrização) e, sobretudo, na concentração de plaquetas num pequeno volume de plasma autólogo, aumentando a concentração de FCD até 94% (Dhillon *et al.*, 2012). Uma vez que existe uma relação proporcional entre a concentração de plaquetas e a concentração de FCD, é expectável que o número de plaquetas no coágulo determine a rapidez da cicatrização.

O PRP aumenta o número de plaquetas e logo os FCD junto à lesão (Marx, 2004; Vendramin *et al.*, 2009). *In vitro*, existe uma relação dose-resposta entre a concentração de plaquetas e a proliferação/diferenciação de MSCs e de fibroblastos (Haynesworth, Kadiyala, Liang & Bruder, 2002; Liu, Kalén, Risto & Wahlström, 2012, citados por Marx, 2004). No entanto, o intervalo óptimo de plaquetas no PRP para atingir fins terapêuticos está ainda por estabelecer (Pietrzak & Eppley, 2005).

Em Medicina Veterinária, existem relatos de diferentes concentrações de plaquetas no PRP nas diferentes espécies, o que dificulta a definição da concentração óptima (Maia & Souza, 2009). Ensaio *in vitro*, em osso e tecido mole, revelaram efeitos biológicos vantajosos (proliferação e diferenciação celular) quando a aplicação de PRP com um milhão de plaquetas/ $\mu$ l (Haynesworth *et al.*, 2002; Weibrich, Hansen & Hitzler, 2004), uma vez que a concentração de plaquetas em indivíduos saudáveis varia entre 150.000 a 350.000 no sangue (média  $200.000 \pm 75.000$  plaquetas/ $\mu$ l) (Marx, 2001; Marx, 2004).

Marx (2004) refere que um milhão de plaquetas corresponde a um aumento de 4 a 5 vezes acima do nível fisiológico, já outros autores constataram que concentrações de plaquetas menores (2,5 vezes superiores aos níveis sanguíneos) são suficientes para estimular a proliferação de fibroblastos em condições *in vitro* (de Mos *et al.*, 2008; Graziani *et al.*, 2006). Haynesworth *et al.* (2002) e Graziani *et al.*,

(2006) observaram que a relação dose-resposta não é linear para a maioria dos FCD contidos no PRP.

Atingido determinado nível, o aumento da concentração de FCD não reflecte efeitos adicionais, pois os receptores celulares para determinados FCD estão saturados (Arnoczky, Delos, & Rodeo, 2011; Marx, 2001). Alcançada uma concentração suficientemente elevada poderão, inclusivamente, exercer efeitos inibitórios nas funções celulares, devido à dessensibilização ou inibição retrógrada dos receptores ou à indução da apoptose celular (DeLong et al., 2012).

Vavken e colegas (2010) descreveram uma diminuição da expressão de receptores para FCD em fibroblastos em função da idade, indicando que não é apenas a concentração de FCD que dita a resposta celular, mas também a capacidade das células alvo usarem os mesmos.

Dado que a relação dose-resposta depende igualmente dos FCD e do tipo celular, a concentração precisa de plaquetas necessária para otimizar a miríade de células envolvidas na reparação tecidual *in vivo* não é clara (Arnoczky *et al.*, 2011).

O efeito da presença de leucócitos na eficácia do PRP não é ainda completamente conhecido e, por conseguinte, os potenciais benefícios e desvantagens da sua inclusão nas preparações de PRP têm sido controversamente debatidos (Arnoczky *et al.*, 2011). Alguns autores consideram que a preparação de PRP beneficia a nível terapêutico se contiver estas células, pois estas aumentam a concentração de FCD no PRP, intervêm na regulação imunitária e possuem efeitos antimicrobianos (McLellan & Plevin, 2011). O coágulo obtido no PRP actua como barreira contra microorganismos invasores (Foster *et al.*, 2009; Werner & Grose, 2003).

Ehrenfest *et al.* (2009) referem que a aplicação de PRP com leucócitos não parece induzir efeitos negativos ou prejudicar os potenciais efeitos benéficos do PRP e que, pelo contrário, contribuirá significativamente para diminuir as necessidades analgésicas dos animais e para potenciar a recuperação funcional.

Apesar destes resultados, outros autores recomendam a eliminação de leucócitos das preparações de PRP porque estas células libertam mediadores pró-inflamatórios que podem exacerbar a lesão inicial, tais como citocinas, metaloproteinasas ou radicais de oxigénio (McLellan & Plevin, 2011). Consequentemente, existe a preocupação de que os leucócitos possam inibir a regeneração em determinados tecidos e/ou em certas fases da recuperação (Arnoczky *et al.*, 2011).

Outros autores sugerem que o PRP rico em leucócitos poderá provocar mais dor local que as preparações puras de PRP (Mei-Dan, Mann, & Maffulli, 2010, citado

por Arnoczky *et al.*, 2011). Não existem, portanto, evidências conclusivas acerca da inclusão ou exclusão de leucócitos no PRP (McLellan & Plevin, 2011).

As proteínas plasmáticas, muitas das quais também encontradas nas plaquetas, são reconhecidas como elementos críticos no mecanismo de reparação tecidual, sendo exemplos a fibrina, a fibronectina e a vitronectina, proteínas que actuam como moléculas de adesão celular em processos como a osteocondução e servem como matriz para a migração epitelial, proliferação óssea e de tecido conjuntivo (Arnoczky *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 2009; Robert & Marx, 2004).

### **1.2.2. Aplicação e segurança do PRP**

Existem dois tipos de abordagem na utilização do PRP: a autóloga e a alogénica. A primeira diminui a transmissão de doenças infecto-contagiosas e as reacções imunológicas por rejeição (Marx *et al.*, 1998; Viegas *et al.*, 2006; Schmidt, 2003). As plaquetas alogénicas podem se tornar inviáveis, não secretando os factores de crescimento activos, além de conter factores de antigenicidade (Marx, 2004).

Quando o PRP é desenvolvido a partir de sangue autólogo, os riscos associados à transmissão de doenças e ao desenvolvimento de reacções imunológicas são mínimos (Everts *et al.*, 2006).

Quando injectado, há algum risco implícito associado à morbilidade do local de injeção, infecção ou lesão de nervos ou vasos sanguíneos, sendo raros os casos relatados de reacções inflamatórias no local de injeção, calcificação ou de formação de tecido cicatricial (de la Mata, 2013; Dhillon *et al.*, 2012).

Alguns autores sugerem, empiricamente, que o PRP poderá favorecer infecções, pois é um coágulo de sangue e nos laboratórios de Microbiologia é usado agar sangue na cultura de bactérias. Todavia, esta lógica é invalidada pelo facto da composição do PRP não diferir relativamente ao coágulo sanguíneo que se forma nas feridas, não promovendo a infecção bacteriana mais que qualquer outro coágulo.

O PRP tem um pH que varia entre 6.5 e 6.7 em comparação com o pH de 7 a 7.2 do coágulo sanguíneo maduro (Marx, 2004). Trabalhos recentes propõem que o PRP poderá mostrar relevantes efeitos antimicrobianos (Bielecki *et al.*, 2007; Drago, Bortolin, Vassena, Taschieri, & Del Fabbro, 2013). Marx (2004) observou que o PRP inibiu o desenvolvimento de infecção em enxertos ósseos e feridas cutâneas.

Como os FCD promovem múltiplas funções celulares que estimulam a proliferação celular, existe também a preocupação de que o PRP possa ser carcinogénico (Everts *et al.*, 2006; Marx, 2001). A capacidade oncogénica está

associada ao potencial angiogénico de determinados FCD (VEGF, bFGF, HGF e IGF) ou mesmo à capacidade intrínseca oncogénica de outros. Recentemente, foi demonstrado que determinados FCD favorecem a proliferação ou activação das células de revestimento de proteína complexa, conhecidas como “células COP”.

Uma vez que os FCD não actuam a nível nuclear, mas na membrana citoplasmática da célula, estes não alteram a expressão génica. Por este motivo, Marx (2001) considera que os FCD não são mutagénicos e que o PRP é incapaz de induzir a formação de tumores. Pelo contrário, os FCD do PRP são proteínas comuns do organismo que actuam no processo normal de cicatrização, mas mais rapidamente.

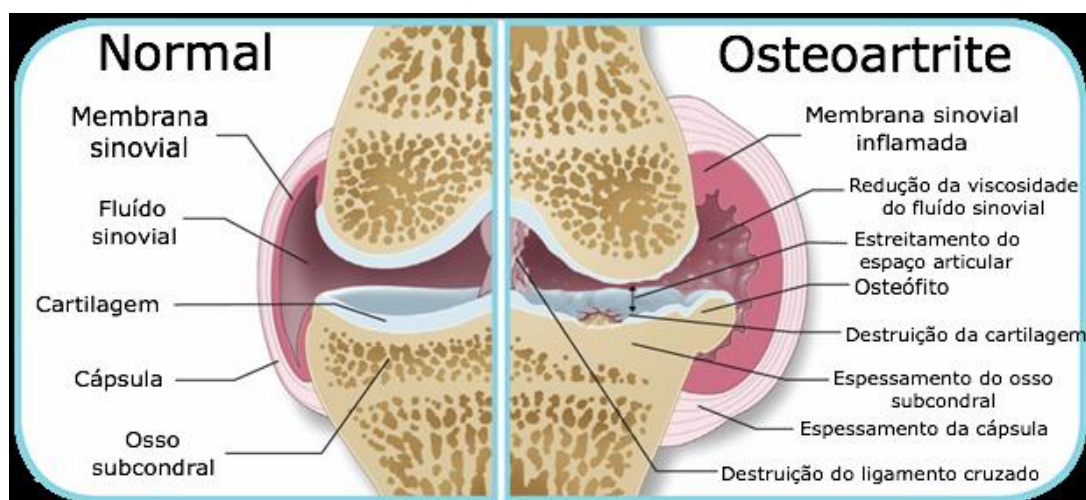
### 1.3. Osteoartrite

A osteoartrite (OA) ou doença degenerativa articular é um termo genérico que engloba os processos patológicos inflamatórios ao nível da articulação sinovial. O grau de inflamação pode variar consoante o tipo de OA e pode ser classificada em inflamatória (imunomediada erosiva ou não erosiva, infecciosa, e induzida por cristais) e não inflamatória (OA primária ou secundária, artrite traumática e artrite coagulopática) (Innes, 2012b).

A OA está associada a alterações do metabolismo do osso subcondral, podendo promover a ocorrência de osteófitos periarticulares e inflamação sinovial, embora seja referida como tendo uma origem não inflamatória (Fossum *et al.*, 2007; Innes, 2012b; Marcellin-Little *et al.*, 2014). É uma doença dinâmica e de progressão lenta, que causa dor significativa, claudicação e incapacidade em animais domésticos.

Existem dois tipos de OA: a OA primária ou idiopática e a OA secundária. A OA primária é um distúrbio do envelhecimento, no qual há degenerescência cartilaginosa por razões desconhecidas (Fossum *et al.*, 2007; Innes, 2012b). A OA secundária ocorre em resposta às alterações que causam a instabilidade articular (por exemplo, a rotura do ligamento cruzado cranial do joelho) ou sobrecarga anormal da cartilagem articular (por exemplo, as anormalidades do desenvolvimento ou anatómicas, como a displasia coxo-femoral) ou por fim, em resposta a outra afecção articular reconhecida (por exemplo a infecção ou inflamação imunomediada). Em carnívoros de companhia, a OA secundária é mais comum do que a OA primária (Fossum *et al.*, 2007; Innes, 2012b).



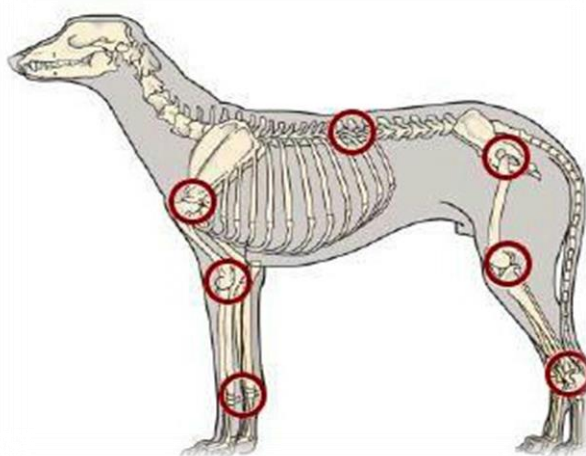


**Figura 4** – Ilustração da articulação do joelho do cão com as alterações osteoártríticas que ocorrem ao longo do tempo (adaptada da página do Animal Hospital of Montgomery, 2014)

### 1.3.1. Diagnóstico da osteoartrite

O diagnóstico de OA é realizado, de forma mais comum, em estados mais avançados do processo degenerativo, após ocorrência de lesões extensas a nível ósseo e articular. Normalmente, é realizado através da observação das alterações imagiológicas de características de doença degenerativa articular. Desta forma, uma intervenção precoce usando modalidades de diagnóstico alternativa é essencial para o bem-estar do animal (Hulse, 2012; Macdonald, 2013).

Os sinais clínicos podem manifestar-se por: dor articular, claudicação, diminuição da amplitude do movimento (ROM) e da força muscular com implicações na capacidade funcional, inatividade, atraso na fase de protração da marcha e dificuldade na postura para defecar (Marcellin-Little, 2005; Millis, 2005; Hulse, 2012; Stubbs, 2013) (Figura 5).



**Figura 5** – Articulações passíveis de serem afectadas por osteoartrite em cães (adaptado de Fox, 2010)

Enquanto que na Medicina Humana há diversos sistemas de estadiamento da doença, através dos seus sinais clínicos (*The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*) ou através da progressão da destruição da cartilagem articular (Classificação de Outerbridge), em Medicina Veterinária não existe nenhuma escala de estadiamento definida (Goldring, 2012).

#### **1.3.1.1. Avaliação imagiológica**

As alterações radiográficas em OA podem ser detectadas tanto nos tecidos mineralizados como nos tecidos moles, contudo pode haver ausência de sinais radiográficos em articulações patologicamente afectadas (Bennett, 2010). Como alterações radiográficas da OA podemos encontrar: osteófitose (Fig. 6-A, B, C e D), entesofitose (Fig. 6-D), efusão sinovial, compressão da gordura infrapatelar (Fig. 6-C), tumefacção dos tecidos moles (Fig. 6-D), esclerose do osso subcondral, estreitamento do espaço articular, mineralização intrarticular e periarticular dos tecidos moles juntamente com calcificação da cápsula, remodelação óssea (Fig. 6-B) e quistos subcondrais (raro) (Taylor, 2009; Bennett, 2010; Innes, 2012).

Apesar de não constituírem um sinal patognomónico neste tipo de artrite, os osteófitos são certamente um marcador útil de diagnóstico da OA, mas o seu valor para o estadiamento desta condição é ainda controverso (Innes, 2012). Apesar de a radiografia ser a modalidade de eleição para detecção de alterações ósseas como osteófitos e a esclerose, esta aporta informação muito limitada sobre os tecidos moles. As alterações radiográficas não são necessariamente associadas à expressão clínica da doença (Bennett, 2010; Innes, 2012). Outras técnicas imagiológicas mais avançadas como a ressonância magnética (RM), a tomografia computadorizada (TC), a cintigrafia nuclear e a artroscopia têm vindo a ser mais utilizadas para a avaliação imagiológica das articulações (MacPhail, 2000; Millis & Fox, 2010).



**Figura 6** – Características radiográficas da osteoartrite (OA) no cão. A, projecção do cotovelo com OA. B, OA nas ancas com osteofitose e remodelação óssea extensiva. C, Alterações típicas no joelho secundárias a ruptura do ligamento cruzado cranial. D, Vista dorsoplantar de OA talocrural secundária a OA dissecante (OCD) (adaptado de Innes, 2012)

A cintigrafia nuclear detecta osso neo-formado em zonas com elevada remodelação óssea. Apesar da sua elevada sensibilidade, é pouco específica, revelando-se de valor clínico limitado (Denoix & Audigié, 2004; Bennett, 2010). Esta tem sido utilizada como um instrumento clínico de pesquisa para avaliar sinais degenerativos ósseos (Innes, 2012).

A artroscopia, geralmente, não é utilizada para fins diagnósticos, mas é uma alternativa valiosa, económica e pouco invasiva de estadiar a OA na articulação canina (Bennett, 2010; Innes, 2012), permitindo avaliar a degradação da cartilagem, as alterações sinoviais e o estado das outras estruturas intrarticulares (Innes, 2012).

A TC fornece informações excelentes sobre as alterações ósseas que ocorrem na OA (Bennett, 2010), mas é menos útil na avaliação do envolvimento de tecidos moles e, por isso, tem recebido menos atenção como modalidade imagiológica para diagnóstico e estadiamento da OA. No entanto, demonstra-se bastante útil na avaliação de articulações com uma anatomia mais complexa como é o caso do

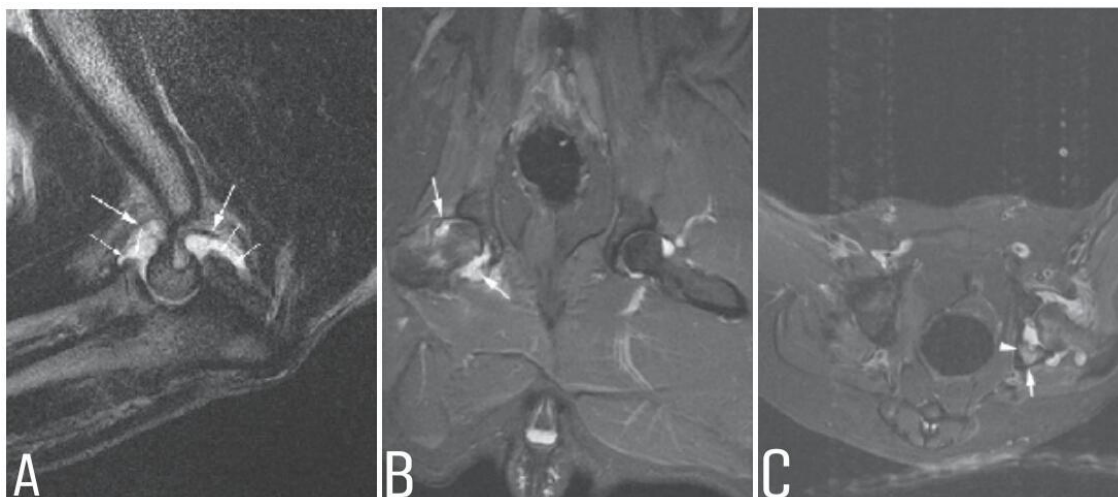
cotovelo (Figura 7), do carpo e do tarso, e é altamente sensível na detecção de osteófitos que podem surgir sobrepostos numa radiografia (Innes, 2012).



**Figura 7** – Tomografia computadorizada dos cotovelos de um cão com fragmentação do processo coronóide medial e alterações secundárias no cotovelo esquerdo (adaptado de MacPhail, 2000)

A RM é mais apropriada do que a TC e está descrita como a técnica *gold standard* para detecção de OA em humanos dado ser a técnica que providencia mais informação sobre os tecidos moles como a cartilagem, ligamentos, meniscos e membrana sinovial, assim como, do tecido ósseo (Figura 8). Utilizada em cães, não dispensa equipamento de alta qualidade, uma vez que as cartilagens articulares caninas são mais finas do que as humanas (Bennett, 2010; Innes, 2012).

A utilização de RM ou de TC também fornece informações importantes relativamente à massa muscular perdida em casos de atrofia (Millis & Levine, 2014).



**Figura 8** – Ressonância magnética: A, Cotovelo de um cão com osteoartrite, as setas maiores indicam efusão e inflamação articular, as setas pequenas apontam para osteófitos no rádio e no processo anconeal. B e C, osteoartrite da articulação coxofemoral, com hiperintensidade do líquido sinovial e do esqueleto. Aparência típica de uma osteoartrite activa (adaptado de Gavin & Holmes, 2009)

### 1.3.2. Tratamento da osteoartrite

Na actualidade, não se conhece nenhum protocolo terapêutico, quer médico quer cirúrgico, que permita obter a cura clínica da OA. Assim sendo, o foco centra-se no controlo da dor com medicação analgésica e anti-inflamatória, na melhoria da função articular e no retardamento do processo degenerativo da articulação. O maneio é multimodal e geralmente envolve o maneio do peso do indivíduo e o exercício controlado.

Suplementos nutricionais podem ser incluídos para ajudar a reduzir os mediadores inflamatórios, promover a saúde e reparação dos condrócitos, bem como para reduzir o dano oxidativo, sendo de particular interesse a utilização dos ácidos gordos (Millis, 2005; Laflamme, 2007; Hulse, 2012; *et al.*, 2014; Shmalberg, 2014).

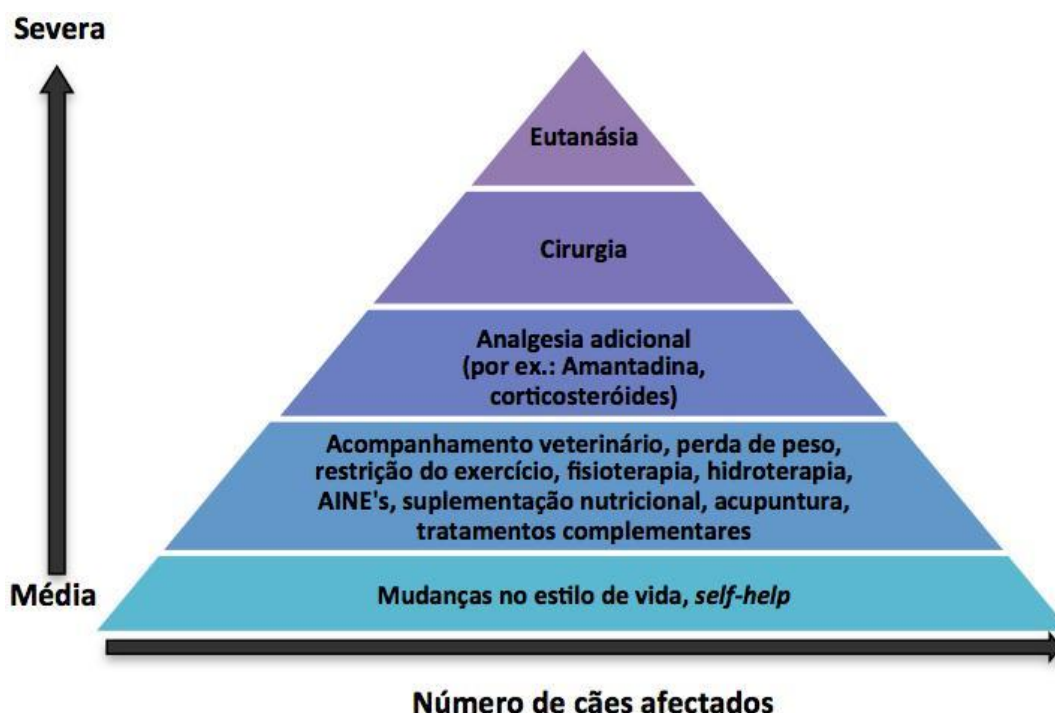
A actividade do animal com OA deve ser alterada a longo prazo, introduzindo as caminhadas curtas e períodos de descanso. O controlo do peso e da condição corporal são importantes na prevenção e/ou atenuação dos efeitos da OA (Millis, 2005; Lascelles, 2006; Fossum *et al.*, 2007; Hulse, 2012; Innes, 2012a,b; Marcellin-Little *et al.*, 2014; Raditic & Bartges, 2014).

O índice de condição corporal recomendado para cães é de quatro e meio numa escala de um a nove e de dois e meio numa escala de um a cinco (Innes, 2012 a).

Os programas típicos de redução de peso corporal indicam uma perda de 1% a 2% por semana até que o índice desejado seja atingido. Um programa de perda de peso pode reduzir consideravelmente o risco de lesões, sobretudo ao nível da articulação do joelho e da anca, e o risco de desenvolvimento secundário de OA (Millis, 2005; Lascelles, 2006; Fossum *et al.*, 2007; Marcellin-Little *et al.*, 2014; Raditic & Bartges, 2014).

A cirurgia revela ser uma alternativa importante no maneio da OA, mas a maioria dos seus benefícios é vista apenas num grupo restrito de animais artríticos, com o objectivo de corrigir instabilidades articulares graves (por exemplo, as lesões ligamentares), remover fragmentos ósseos e de cartilagem; realizar osteotomias correctivas para alteração do suporte de carga; e como procedimento de último

recurso em doenças articulares terminais (Read, 2011; Macdonald, 2013; Marcellin-Little *et al.*, 2014).



**Figura 9** – Esquema das etapas de tratamento da osteoartrite canina, segundo a gravidade da doença (adaptado de Innes, 2012).

## 1.4. Tratamento da osteoartrite com abordagens de Medicina Regenerativa

### 1.4.1. Plasma rico em plaquetas

A maioria dos estudos relatam uma melhoria significativa da regeneração do osso e/ou do tecido mole quando o PRP é usado (Camargo *et al.*, 2002; Man *et al.*, 2001; Marx *et al.*, 1998; Marx, 2004). Não obstante, existem também publicações que concluem haver pouco ou nenhum benefício na utilização do PRP (Aghaloo *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2002; Danesh-Meyer *et al.*, 2001).

Marx (2004) compara trabalhos com resultados controversos e refere que os estudos sugerem poucos benefícios no uso de PRP que, frequentemente, é aplicado com recurso a técnicas inadequadas, não sendo possível retirar conclusões válidas. Dado que o PRP não é osteoindutivo, isto é, não possui proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), o valor do PRP está maioritariamente relacionado com a melhoria da cicatrização de tecidos moles; todavia, os FCD estimulam a diferenciação de MSCs e de células da sua linhagem em células osteogénicas, acelerando a

formação de osso (Marx, 2004). Por conseguinte, este autor acredita que não são esperados benefícios provenientes da associação de PRP com substitutos ósseos ou com outros enxertos não celulares.

Porém, trabalhos sobre a associação de PRP a osso bovino inorgânico (Bio-Oss, Osteohealth, EUA) demonstraram, mais uma vez, resultados contraditórios. Actualmente, o PRP tem aplicação clínica quando associado a enxertos ósseos totalmente autólogos, a misturas de enxertos ósseos (com uma variedade de substitutos ósseos e um mínimo de 20% de osso autólogo) e a factores de crescimento recombinantes, como BMP recombinantes (Arnoczky *et al.*, 2011; Freymiller & Aghaloo, 2004).

O PRP permite também a aplicação precoce de implantes, facilitando a manipulação de enxertos ósseos ao actuar como adesivo e beneficia a osteointegração quando aplicado em osso osteoporótico ou após tratamento de radioterapia (Arnoczky *et al.*, 2011; Freymiller & Aghaloo, 2004).

O facto de o PRP melhorar a cicatrização dos tecidos moles que envolvem os defeitos ósseos, sustenta uma reparação do osso mais rápida, pois possibilita uma melhor cobertura do microambiente ósseo em cicatrização (Pardo, Sacco, Surian & Alvarenga, 2012).

A administração conjunta de PRP e de outros factores biológicos tem sido explorada com o intuito de amplificar o seu poder regenerativo. Apesar de ser um conceito relativamente recente, a estratégia é apelativa pelo facto da matriz regenerativa resultar entregar uma potente trilogia de células indiferenciadas, matriz de fibrina e FCD (Sánchez-González *et al.*, 2012). A aplicação concomitante de células estaminais derivadas do tecido adiposo (ASCs) e da medula óssea (BMSCs) é considerada uma das terapias mais promissoras (Coppi, 2012; Gentile *et al.*, 2012b; Pham *et al.*, 2013; Pieri *et al.*, 2009)

Trabalhos experimentais comprovam as potencialidades terapêuticas desta terapia no tratamento de lesões ósseas, tendinosas e articulares e na cirurgia reconstrutiva de tecidos moles (Coppi, 2012; Gentile *et al.*, 2012b; Pham *et al.*, 2013; Pieri *et al.*, 2009).

Outras possibilidades incluem a adição de factores à terapia combinada de PRP e MSCs, tais como a fluoridroxiapatita e a insulina recombinante, aplicados respectivamente para promover a regeneração óssea e a integração de transplantes de tecido adiposo (Gentile *et al.*, 2012a; Pieri *et al.*, 2009). Gimeno e colaboradores (2006) referem ainda a aplicação do PRP como vector de substâncias químicas, tais como agentes anti-angiogénicos.

### 1.4.2. Terapias celulares

As terapias celulares baseiam-se nos métodos de transferência de células com fins terapêuticos para diversas doenças com a expectativa de que estas proliferem, se diferenciem ou segreguem factores que promovam a regeneração dos tecidos lesados. Quando realizada, produz-se uma série de factores que podem ser a favor ou contra o processo (Singh & Williams, 2008; Rocha *et al.*, 2012; Müller, 2013; Eridani, 2014).

O número de estudos sobre terapias regenerativas utilizando as células estaminais (SCs) tem aumentado consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo (Singh & Williams, 2008; Del Carlo *et al.*, 2009; Filho *et al.*, 2013; Eridani, 2014).

As células estaminais têm sido usadas no tratamento de várias doenças ortopédicas, incluindo OA, não-uniões ou atraso na união de fracturas, lesões músculo-tendinosas e lesões ligamentares (Singh & Williams, 2008; Del Carlo *et al.*, 2009; Filho *et al.*, 2013; Eridani, 2014)

Existem poucos efeitos secundários ou complicações associadas ao seu uso. As células estaminais podem ser classificadas como totipotentes (zigoto), pluripotentes (embrionárias) e multipotentes (adultas). As células mais usadas em aplicações ortopédicas são as células estaminais adultas multipotentes derivadas do tecido adiposo (ASCs).

Este tipo celular tem a capacidade de se diferenciar em tecidos de origem mesodérmica, tais como o osso, os tendões e ligamentos, a cartilagem e o tecido adiposo. As ASCs têm também a capacidade de secretar indutores de crescimento incluindo o VEGF, factores de crescimento dos hepatócitos (HGF) e IGF-1 e possuem propriedades anti-inflamatórias e anti-fibróticas (Fox & Miller, 2011; Beale, 2014; Canapp, 2014a; Canapp & Saunders, 2014; Conzemius, 2014a; Duerr, 2014).

Estas células estaminais já foram usadas com sucesso no tratamento de animais com OA moderada a grave (Brehm, 2014), através da injeção em articulações afectadas usando uma técnica estéril e sob anestesia ou sedação (Brehm, 2014).

A melhora clínica foi observada na maioria dos animais, mas não se esperava que este tratamento eliminasse por completo os sinais clínicos. A duração das melhorias em relação à função do membro variou nos animais osteoartrosicos (semanas a meses), podendo ter sido necessário repetir as injeções.

As articulações mais frequentemente tratadas para OA usando células estaminais são as da anca, joelho e cotovelo, contudo, qualquer articulação artrosica



pode beneficiar deste tratamento. Estudos revelaram melhorias significativas na função do cotovelo em 30-40% e uma duração de efeito de pelo menos 180 dias (Fox & Miller, 2011; Beale, 2014).

A seguir ao tratamento com células estaminais, os animais são frequentemente submetidos a um período de restrição de exercício e algum grau de imobilização do membro. A medicina física pode ser usada duas a quatro semanas após o tratamento com células estaminais (Fox & Miller, 2011; Beale, 2014).

Uma sinergia entre as células estaminais e o plasma rico em plaquetas tem sido descrita, uma vez que determinados factores de crescimento e citocinas libertados a partir das plaquetas ligam-se aos receptores da superfície das células estaminais, iniciando-se a expressão génica e proliferação de células estaminais (Monteiro *et al.*, 2010a; Gade *et al.*, 2012)

Estudos recentes têm sido realizados descrevendo a utilização alogénica e autóloga das MSCs para a regeneração de diversos tecidos. Para além da aplicação directa na prática da Medicina Veterinária, esta investigação visa também o desenvolvimento de modelos experimentais, nos quais se estudam tratamentos para futura translação para os doentes humanos (Monteiro *et al.*, 2010a; Gade *et al.*, 2012).

A abordagem alogénica permite a utilização destas terapias em indivíduos em estados mórbidos desfavoráveis que não precisam de submeter-se à colheita de MSCs e reduzir-se-ia a espera do mesmo pelo tratamento, uma vez que a cultura de MSCs já está disponível (Monteiro *et al.*, 2008).

O uso terapêutico das SCs ainda é questionado pela falta de protocolos, tanto sobre a melhor forma de isolamento, vias (intravenosa ou intralesional) e doses de administração para cada problema em específico. Sabe-se que as SCs possuem a capacidade de migrar até aos órgãos e tecidos lesados (biodistribuição) e, além disso, usufruem de fortes propriedades imunomoduladoras (Le Blanc & Pittenger, 2005).

Estudos demonstraram a acção parácrina das SCs através da secreção de citocinas que têm influência sobre as células adjacentes, aumentando a sobrevivência celular e activando mecanismos endógenos de regeneração (Gnecchi *et al.*, 2008; Burdon *et al.*, 2011).

### **1.4.3. Ácido hialurónico**

Quando existe dor osteoartítica numa só articulação, podem ser injectadas intrarticularmente preparações de ácido hialurónico (AH), um glicosaminoglicano não sulfatado. O benefício terapêutico do AH é ainda muito controverso pois os seus mecanismos de acção são incertos (Schaible, 2012). Os estudos existentes são muito

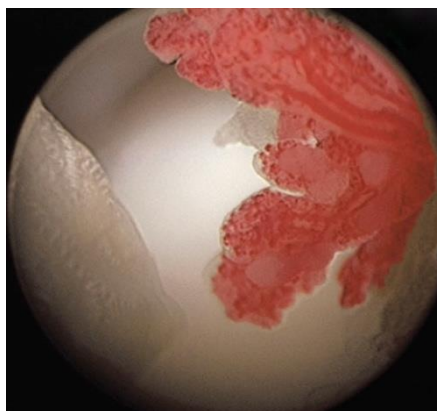
heterogéneos, pouco consistentes com resultados conflituosos e díspares. Já foi possível observar o seu efeito antinociceptivo em modelos animais (Gomis *et al.*, 2009, Boettger *et al.*, 2011 cit in. Schaible, 2012).

Pensa-se que a sua propriedade viscosa promova uma protecção mecânica ou que recubra os terminais nervosos sensíveis a mediadores inflamatórios. Contudo, há que relembrar que o AH representa uma grande componente do fluído sinovial e realiza funções troficometabólicas importantes (Gomis *et al.*, 2009, Boettger *et al.*, 2011 cit in. Schaible, 2012).

#### 1.4.4. Inibição da angiogénese

O tratamento da dor através da inibição da angiogénese através da injeção IA de dexametasona e indometacina ou do inibidor de angiogénese PPI-2458 está comprovada em modelos animais. Sabemos que na OA as fibras nervosas juntamente com os capilares penetram na cartilagem facilitando a inflamação e, consequentemente, provocando dor (Ashraf *et al.*, 2011 cit in. Schaible, 2012).

Existem ainda outras terapêuticas em estudo, tais como a neutralização de citocinas inflamatórias intrarticulares (TNF- $\alpha$  e IL-6), a utilização de canabíoides nos receptores CB1 e CB2 e ainda, os bloqueadores de canais de sódio para reduzir a excitação das fibras nervosas aos estímulos nocivos e a hiperalgesia (Richter *et al.*, 2010, Schaible *et al.*, 2010, Schuelert *et al.*, 2010, Schuelert *et al.*, 2012 cit in. Schaible, 2012; van der Berg, 2011 cit in. Goldring, 2012).



**Figura 10** – Imagem artroscópica de sinovite onde se observa uma massa tipo couve-flor característica do fenómeno angiogénico (adaptado de Fox, 2010)

O objectivo deste estudo foi o de avaliar o efeito da terapia alogénica com o PRP sobre a dor e sobre a função articular em cães com osteoartrite.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado com base nos dados clínicos de cães procedentes de consultas do Hospital Veterinário da Arrábida, situado em Portugal na freguesia de Setúbal, no mês de Novembro de 2015, contando com a cooperação da Prof.<sup>a</sup> Ângela Martins.

### 2.1. População estudada

A população estudada foi composta por cinco cães (Tabela 7) com diagnóstico clínico e imagiológico de osteoartrite. Todos os animais foram submetidos a uma consulta de Medicina de Reabilitação prévia e sujeitos a tratamento alogénico único com plasma rico em plaquetas (PRP).

**Tabela 7-** Informação dos cinco cães estudados em relação à raça, idade e local da osteoartrite.

| Animal | Raça               | Idade   | Local da osteoartrite               |
|--------|--------------------|---------|-------------------------------------|
| 1      | SRD                | 12 anos | OA femuro-tíbio-patelar             |
| 2      | Labrador Retriever | 10 anos | OA na articulação tíbio-társica     |
| 3      | Labrador Retriever | 13 anos | OA femuro-tíbio-patelar             |
| 4      | Pastor Alemão      | 14 anos | OA na articulação umero-rádio ulnar |
| 5      | Braco Alemão       | 6 anos  | OA na articulação do carpo          |

### 2.2. Abordagem terapêutica antes da terapia com PRP

Todos os animais apresentaram uma evolução crónica da doença degenerativa articular (OA), entrando nas consultas de reabilitação ortopédica, com vários graus de claudicação e de dor, como descritos, na Tabela 8.

**Tabela 8-** Grau de claudicação e de dor dos animais estudados no dia 0 do estudo.

| Animal | Grau de claudicação no dia 0 | Grau de dor no dia 0 |
|--------|------------------------------|----------------------|
| 1      | Grau III                     | Intensa              |
| 2      | Grau II                      | Moderada             |
| 3      | Grau IV                      | Intensa              |
| 4      | Grau III                     | Grave                |
| 5      | Grau II                      | Moderada             |

Dado que os animais tinham uma doença ortopédica degenerativa crónica articular, foram submetidos, previamente, a protocolos multidisciplinares para o manejo da dor e da função biomecânica da marcha.

No presente estudo, os cinco animais estiveram, durante os 6 meses anteriores, sem aplicação de nenhum manejo farmacológico ou modalidade terapêutica de reabilitação da doença OA.

De seguida, descreve-se, sucintamente, o protocolo farmacológico que estes cães foram submetidos até 6 meses antes do início do estudo e ainda o tipo de modalidades terapêuticas de reabilitação que realizaram ao longo do processo evolutivo da doença da OA, até à data já referida. Foi utilizado o mesmo protocolo farmacológico e de modalidade terapêutica de reabilitação aos 5 cães. É importante salientar que o animal 2 só realizou o manejo farmacológico da dor.

O manejo farmacológico da dor incluiu:

- Anti-inflamatório não esteroide, meloxicam (0,1 mg/kg, *per os*, SID) durante 8 a 15 dias e em situações de dor aguda, foi prescrito:
- Tramadol (2-4 mg/kg, *per os*, Bid/Tid);
- Gabapentina (5-10 mg/kg, *per os*, Bid/Tid).

### **2.2.1. Protocolo de modalidades terapêuticas de reabilitação utilizado no Animal 1**

No animal 1 prescreveu-se a terapia de ondas choque. As ondas choque são uma nova solução não-invasiva para a dor músculo-esquelética crónica. As ondas choque são utilizadas para várias doenças ortopédicas como por exemplo, a osteomielite, não uniões, problemas de ligamentos e tendinites e ainda todos os processos degenerativos articulares como por exemplo a displasia da anca e do cotovelo. Neste estudo utilizou-se o equipamento da PulseVet (PulseVet, EUA), como referido na Figura 11.



**Figura 11** – Equipamento utilizado na terapia de ondas-choque extracorpórea

Técnica utilizada: Técnica de varredura e pontos.

Sedação utilizada: buprenorfina (0,015 mg/Kg, IV) 1h antes do procedimento + propofol (dose efeito/bolus, IV).

A sonda utilizada foi de 20 mm (mais potente). Esta escolha justifica-se pelo facto de a articulação coxo-femural ser uma articulação profunda e, por isso, ser necessário uma maior potência. Foi utilizado 1000 pulsos e o nível de energia máximo E6.

### **2.2.2. Protocolo de modalidades terapêuticas de reabilitação utilizado nos Animais 3 e 4**

No animal 3 e 4 prescreveu-se a terapia com laser, electroestimulação e hidroterapia. A terapia com LASER (do Inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) consiste na aplicação de um feixe de radiação eletromagnético colimado sobre os tecidos (Botey, 2014a; Millis & Saunders, 2014; Van Dyke, 2010). O equipamento de LASER é classificado de acordo com a sua intensidade e comprimento de onda, podendo ser classificado em LASER classe I, classe II, classe IIIa, classe IIIb e classe IV.

A terapia com LASER encontra-se indicada em casos de displasia da anca, artrite, lesões cutâneas, cistite idiopática, otite, gengivite, doença periodontal, etc.

Nos animais 3 e 4 foi utilizado o LASER classe IV que apresenta uma intensidade superior a 500 mW e um comprimento de onda de 980 nm, obtendo assim um poder de penetração elevado (Godbold, 2011; Martins, 2012; Niebaum, 2013; Millis & Saunders, 2014; Botey, 2014a).

Neste estudo utilizou-se o equipamento da Lite Cure Companion Therapy Laser (Lite Cure, EUA). Com o programa “Pain Trauma”, após especificações das constantes paramétricas em relação ao peso vivo, comprimento do pêlo, cor da pele e área a tratar.



**Figura 12** – Equipamento de terapia com LASER classe IV

Técnica utilizada: Técnica de varredura rápida no programa de 8 a 10 J.

Protocolo: nos primeiros 5 dias seguidos. Posteriormente, 5 vezes de 48 em 48h e, por fim, 5 vezes de 72 em 72h.

A electroestimulação consiste na aplicação de uma corrente eléctrica de frequência inferior a 250 Hz com o objectivo de estimular nervos sensoriais ou motores (Martins, 2012; Botey, 2014a; Levine & Bockstahler, 2014). Existem três tipos de estimulação eléctrica: estimulação eléctrica neuromuscular (NMES), estimulação eléctrica nervosa transcutânea (TENS) e estimulação eléctrica muscular (EMS) (Bockstahler et al., 2004b; Botey, 2014a; Levine & Bockstahler, 2014).

O tipo da estimulação eléctrica utilizada nos dois animais 3 e 4 foi a TENS (do Inglês, *Transcutaneous electrical neuro stimulation*) não provoca contracção muscular, actuando nos nervos sensoriais e activando sistemas de controlo neural da dor para provocar analgesia em músculos, articulações ou na coluna vertebral (Bockstahler et al., 2004b; Bher & Green, 2012; Niebaum, 2013; Botey, 2014a; Levine & Bockstahler, 2014).

O equipamento utilizado no estudo foi o BTL 4000 Premium (BTL, Portugal).



**Figura 13** – Equipamento de terapia com electroestimulação

Nesta terapêutica, aplicaram-se os eléctrodos segundo a técnica local, ou seja, colocação dos electródos na face lateral e medial perto do epicôndilo lateral e medial respectivamente do fémur, com os seguintes parâmetros energéticos.

- 60 Hz, 3 mA: descarga da corrente durante 2 segundos, repouso durante 4 segundos;
- Tipo de corrente rectangular.

Estes doentes foram sujeitos a protocolos locomotores em meio aquático, utilizando uma passadeira aquática, permitindo a realização de hidroterapia.

A hidroterapia é um recurso de extrema importância na Medicina de Reabilitação Veterinária, devido ao facto de a água apresentar características únicas que distinguem esta forma de terapia das restantes (Monk, 2007; Flocker *et al.*, 2014; Hernández, 2014). As propriedades da água devem ser entendidas, permitindo a compreensão dos benefícios da hidroterapia, bem como a formulação de planos de reabilitação aquática adequados (Flocker *et al.*, 2014; Hernández, 2014). Esta abordagem beneficia do uso das propriedades da água, tais como:

- Densidade relativa;
- Flutuabilidade;
- Pressão hidrostática;
- Viscosidade;
- Resistência;
- Tensão superficial.

O equipamento utilizado no estudo foi a passadeira aquática (Physio, EUA).



**Figura 14 – Hidroterapia**

Após a utilização do LASER, passados 40 minutos, os cães iniciavam treino locomotor na passadeira aquática, com a água a nível do trocânter maior, de modo a que a articulação em causa ficasse dentro de água, com velocidade de 1,5 ou 2,5 km/h.

Todos os animais foram sujeitos ao mesmo protocolo na passadeira aquática, que vai ser descrito na Tabela 9.

**Tabela 9-** Protocolo do treino locomotor na passadeira aquática.

| Semana | Minutos | Velocidade (km/h) |
|--------|---------|-------------------|
| 1      | 5       | 1,5               |
| 2      | 10      | 2                 |
| 3      | 15      | 2,5               |
| 4      | 20      | 3                 |

Após 40 minutos do treino locomotor, procedeu-se à realização da recolha sanguínea na veia jugular e a monitorização da análise bioquímica de lactato, cujo os valores normais inferiores a 2,5 mg/dl, de modo a evitar que os doentes entrassem em trabalho anaeróbico.

### **2.2.3. Protocolo de modalidades terapêuticas de reabilitação utilizado no Animal 5**

No animal 5 prescreveu-se a terapia com diatermia, também conhecida como terapia por Transferência de Energia Capacitiva e Resistiva (TECAR), é uma técnica que estimula o processo de cicatrização fisiológica ao acelerar o tempo de recuperação da função motora. A diatermia estimula a produção de calor endógeno dos tecidos através da interação do campo electromagnético e os tecidos. O calor é produzido de um modo controlado e uniforme. A interação eletromagnética resulta num fluxo iónico e, consequentemente, aumenta o fluxo sanguíneo na área tratada. Este processo estimula a libertação de substâncias endógenas, em particular, cortisol e endorfinas que são indispensáveis para reduzir inflamações, dores e edemas (Sorisa, Portugal).

O animal 5, além de ter feito as modalidades aplicadas nos animais 3 e 4, também fez diatermia, pois tinha secundário à OA e ao mau apoio, uma instabilidade no ombro. Este fez diatermia no modo capacitivo de 1º a 24°C para os músculos trícipes e no modo resistivo até 6°C para a articulação referida.

O equipamento utilizado no estudo foi BTL 4000 Premium (BTL, Portugal).





**Figura 15** – Terapia com diatermia

## 2.3. Aplicação do PRP

As articulações osteoartíticas dos cinco animais estudados foram submetidas a terapia alogénica com PRP proveniente da empresa Vetherapy, empresa Portuguesa da área biotecnológica e Medicina Regenerativa.

Para obtenção do PRP, foi previamente colhido sangue venoso para sacos de colheita para transfusão de 250 ml com citrato-fosfato-dextrose (CPD) após venopunção da veia jugular externa.

O sangue foi enviado para o laboratório e, no prazo de 12 horas, o mesmo foi processado através da técnica de centrifugação com padronização do número de plaquetas por ml, tendo sido o PRP dos cinco dadores misturado.

O PRP obtido foi armazenado e enviado para o centro médico-veterinário em *vials* de 1,5 ml e congelados em gelo seco. O mesmo PRP foi aplicado em todos os cães, dos quais se obteve o sangue, recorrendo a uma abordagem alogénica.

Nas articulações referidas na Tabela 7, o PRP foi injectado por via intra-articular e de forma ecoguiada (Figura16). Após esta intervenção, os animais foram avaliados passados 30, 60 e 90 dias.



**Figura 16-** Injecção de PRP por via intra-articular, após localização ecoguiada da cavidade articular.

## 2.4. Parâmetros avaliados

Os casos clínicos foram analisados, individualmente, de modo a seleccionar a informação mais relevante para a doença em estudo. Os animais estudados foram avaliados pelos seguintes parâmetros: raça; idade; etiologia; claudicação ao dia 0; claudicação ao dia 30; claudicação ao dia 60 e claudicação após 90 dias; grau de dor ao dia 0; grau de dor ao dia 30; grau de dor ao dia 60 e grau de dor após 90 dias.

A escala de claudicação foi classificada desde o grau I ao grau V. A escala de dor foi avaliada através da palpação e foi classificada da seguinte forma: grau 0 corresponde à ausência de dor, sem manifestação clínica; grau 1 corresponde a dor ligeira, o animal recolhe o membro mas não vocaliza nem olha para o membro, grau 2 corresponde a dor moderada, o animal recolhe o membro, não vocaliza mas olha para o membro, grau 3 corresponde a dor intensa, o animal recolhe o membro, vocaliza e olha para o membro e, por fim, grau 4 corresponde a dor grave, o animal recolhe o membro, vocaliza, morde e olha para o membro.

Em relação à idade, foram definidos os seguintes escalões etários: um cão adulto com seis anos de idade e quatro cães geriátricos com idade superior a 8 anos. Relativamente às raças, estas foram: um SRD; dois Retriever Labrador, um Pastor Alemão e um Braco Alemão.

A recolha de dados consistiu na consulta das fichas clínicas dos respectivos animais atendidos no Hospital Veterinário Central da Arrábida, um ano após a administração do PRP. A evolução dos casos foi registada através do acompanhamento das consultas de controlo realizadas pela Prof.<sup>a</sup> Ângela Martins.

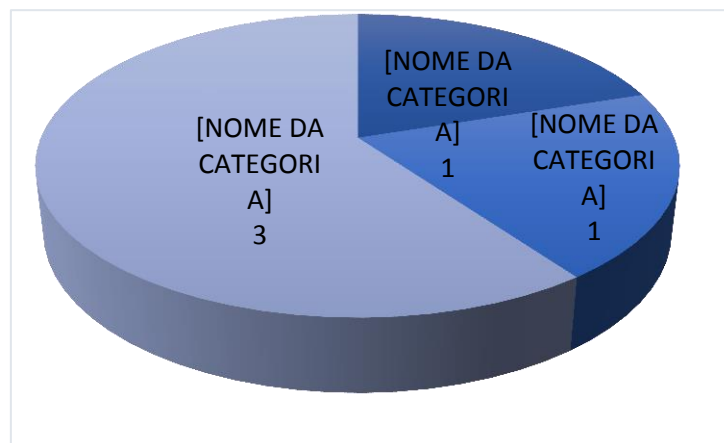
## 2.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram alvo de uma análise estatística descritiva que incluiu o cálculo de frequências absolutas e relativas, médias e desvio padrão, utilizando como ferramenta o programa informático Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, Estados Unidos da América).

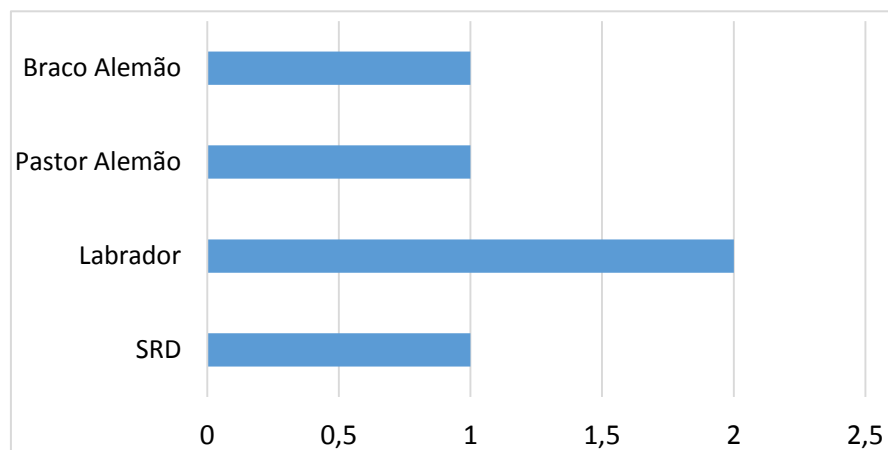
## 3.RESULTADOS

### 3.1 Caracterização da população estudada

A população em estudo foi constituída por cinco cães com idade entre os 6 e os 14 anos (Figura 16). Quanto à raça dos animais em estudo, 40% dos cães são da raça Labrador Retriever e os restantes pertenciam às seguintes raças: sem raça definida, Pastor Alemão e Braco Alemão (Figura 17).



**Figura 17-** Distribuição etária dos animais em estudo



**Figura 18-** Distribuição das raças dos animais em estudo

## 3.2 Evolução clínica

Na Tabela 10, descreve-se a evolução clínica dos animais em estudo após a administração de PRP. É possível observar que todos os animais obtiveram uma melhoria após os 90 dias da administração. Neste quadro, foram avaliados oito parâmetros principais: o grau de claudicação no dia 0, no dia 30, no dia 60 e após os 90 dias (Tabela 10) e o grau de dor no dia 0, no dia 30, no dia 60 e após 90 dias (Tabela 11).

Verificou-se que todos os animais diminuíram o grau de claudicação após 90 dias, sendo que, o animal 2 deixou de claudicar. Quanto à dor, também houve resultados positivos, sendo que os 3 primeiros animais revelaram não ter dor, enquanto que os animais 4 e 5 passaram de dor grave e moderada, respectivamente, para dor ligeira.

**Tabela 10-** Evolução do grau de claudicação após a administração de PRP nos casos clínicos em estudo.

| Animal | Doença                              | Dia 0    | Dia 30   | Dia 60  | Após 90 dias    |
|--------|-------------------------------------|----------|----------|---------|-----------------|
| 1      | OA femuro-tibio-patelar             | Grau III | Grau II  | Grau II | Grau I          |
| 2      | OA na articulação tíbio-társica     | Grau II  | Grau II  | Grau I  | Sem claudicação |
| 3      | OA femuro-tibio-patelar             | Grau IV  | Grau III | Grau II | Grau II         |
| 4      | OA na articulação umero-rádio ulnar | Grau III | Grau III | Grau II | Grau II         |
| 5      | OA na articulação do carpo          | Grau II  | Grau II  | Grau I  | Sem claudicação |

**Tabela 11** - Evolução do grau de dor após a administração de PRP nos casos clínicos em estudo.

| <b>Animal</b> | <b>Doença</b>                       | <b>Dia 0</b> | <b>Dia 30</b> | <b>Dia 60</b> | <b>Após 90 dias</b> |
|---------------|-------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------------|
| <b>1</b>      | OA femuro-tibio-patelar             | Intensa      | Moderada      | Ligeira       | Sem dor             |
| <b>2</b>      | OA na articulação tíbio-társica     | Moderada     | Ligeira       | Ligeira       | Sem dor             |
| <b>3</b>      | OA femuro-tibio-patelar             | Intensa      | Moderada      | Ligeira       | Sem dor             |
| <b>4</b>      | OA na articulação umero-rádio ulnar | Grave        | Intensa       | Ligeira       | Ligeira             |
| <b>5</b>      | OA na articulação do carpo          | Moderada     | Ligeira       | Ligeira       | Ligeira             |

Todos os animais do estudo foram acompanhados durante 90 dias pela Prof.<sup>a</sup> Ângela Martins. Nos dois animais que apresentavam claudicação grau III, após noventa dias de ter sido administrado o PRP, verificou-se uma melhoria respectivamente para os graus I e II. Os dois animais que apresentaram claudicação grau II evoluíram para o grau 0, ou seja, sem claudicação. O único animal do estudo com claudicação grau IV depois da aplicação de PRP passou para grau II.

## 4. DISCUSSÃO

O objectivo do uso deste tipo de terapias, como é o caso do PRP, consiste em estimular a regeneração de tecidos lesionados e que têm uma capacidade natural regenerativa fraca como tendões, ligamentos, meniscos e cartilagens (Stocum, 2006 citado por Gutierrez-Nibeyro, 2011). Pelo menos um estudo, com lesões ósseas experimentalmente induzidas em cães, indicou que as lesões reparadas com enxerto ósseo na presença de PRP apresentaram melhor recuperação do que na ausência de PRP (Barbosa *et al.*, 2008).

O presente estudo foi realizado com base nas evidências descritas em vários estudos sobre PRP aplicado na regeneração óssea e de cartilagem, de pele de músculo (Liebermain *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2008; Lemos; Rossi Junior; Pispico, 2008). Lee e colaboradores (2001) fizeram uso de fibroblastos expressando actividade TGF- $\beta$ 1 e mostraram resultados em que o PRP foi capaz de regenerar cartilagem hialina em joelhos de coelhos com lesões induzidas.

A segurança do método de injeção intra-articular de elementos estimuladores da reparação tecidual foi demonstrada anteriormente por Schmidt; Chen; Lynch (2006) que utilizaram o factor de crescimento plaquetário (PGDF) em injeções intra-articulares em ratos esqueleticamente imaturos e concluíram que o procedimento foi bem tolerado pelos ratos jovens com cartilagem normal.

Neste estudo, os resultados clínicos obtidos foram promissores, porque houve boa tolerância pelos doentes, visto que clinicamente não ocorreu qualquer resposta sugestiva de fibrose ou processo inflamatório articular dos cães tratados.

Estudos em equinos evidenciaram que o tratamento intralesional de PRP promoveu resolução de quadros de tendinite, associada à diminuição da claudicação, do edema, da sensibilidade e do calor local, além da melhora na imagem ecográfica das estruturas avaliadas (Meirelles *et al.*, 2010). Na mesma espécie, ainda foi constatada a eficácia do PRP em lesões condrais induzidas (Yamada *et al.*, 2012). Presentemente, o PRP é utilizado sobretudo em reconstruções ósseas, electivas e traumáticas (fractura, não-união), sob a forma de um gel onde é adicionado um enxerto de osso esponjoso, ou uma matriz óssea desmineralizada, para permitir a osteocondução (Wroblewski *et al.*, 2010).

A capacidade desta terapia em acelerar a consolidação e a reparação óssea já foi alvo de muitos estudos envolvendo lesões ósseas, realizados principalmente com modelos animais (Barbosa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Kanthan, Kavitha, Addi, Choon & Kamarul, 2011). Os factores PDGF, TGF- $\beta$  e IGF-1 contribuem para um processo angiogénico mais acelerado e intenso, permitindo a formação precoce de

redes vasculares, com uma produção osteóide maior e em menor tempo (Barbosa *et al.*, 2008).

Estes estudos referem que o preenchimento dos defeitos ósseos apenas com PRP não apresenta nenhuma vantagem relativamente ao não preenchimento das mesmas, porque os FCD necessitam da presença de células provenientes de um enxerto ósseo para manifestarem a sua acção terapêutica (Barbosa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Kanthan *et al.*, 2011).

Em Medicina Humana já foram efectuados ensaios clínicos sobre a aplicação do PRP na articulação do joelho (Foster *et al.*, 2009). Em Medicina Veterinária, Carmona e colegas (2007) verificaram o efeito clínico das injeções intra-articulares de PRP em equinos com OA. O plano de tratamento proposto por Carmona e colaboradores (2007) para o tratamento de OA com PRP foi empírico, baseado apenas nos protocolos de manejo de artropatias inflamatórias graves em humanos.

No referido trabalho, foram aplicadas três administrações de PRP, com duas semanas de intervalo. A quantidade de PRP introduzido dependeu do tipo e tamanho da articulação, bem como do peso vivo de cada indivíduo. Foi observada melhoria gradual da claudicação, principalmente entre os dois e os oito meses após a terceira injeção. A diminuição da efusão articular ocorreu durante o tratamento e até dois meses após a última injeção (Carmona *et al.*, 2007).

O presente estudo está de acordo com a literatura, mas, devido a razões económicas foi possível apenas uma administração de PRP, contudo, foi possível observar um resultado positivo nos cinco cães.

Noutro estudo, Abellanet e Prades (2009a), em quarenta e dois cavalos de desporto com lesões de OA, observou que, dos cavalos que receberam terapia com PRP, 70% retomaram o seu trabalho e desses animais apenas 9,5% sofreu recidiva dos sinais clínicos, enquanto que, comparativamente ao grupo de controlo, em que 75% dos animais retomaram o seu trabalho, 33% dos cavalos sofreram recidiva dos sinais clínicos. (Abellanet & Prades, 2009a). O que demonstra que a terapia com PRP foi eficaz neste estudo, em relação ao grupo de controlo. Em ambos os estudos publicados não foram relatados efeitos secundários, locais ou sistémicos, após a aplicação de PRP (Carmona *et al.*, 2007; Abellanet & Prades, 2009a).

Num estudo sobre a utilização de sinais moleculares no tratamento da OA em Medicina Veterinária concluí-se que a proteína antagonista do receptor da interleucina 1 (IRAP) e o PRP revelaram ser terapêuticas inovadoras no tratamento de doenças músculo-esqueléticas em cães e cavalos, necessitando, nos últimos, de uma maior investigação clínica.

A aplicação combinada de PRP com células estaminais, como por exemplo de ASCs, em doenças osteoarticulares em cães tem-se revelado promissora pela eficácia significativa que tem no tratamento das mesmas melhorando o bem-estar dos animais durante o período de recuperação.

Nos equinos, embora a investigação nesta área seja ainda limitada, a investigação em curso vai no sentido de apoiar o uso destas terapias mistas neste tipo de lesões. As terapias à base de ASCs têm um potencial regenerativo devido à capacidade de se diferenciarem nas células do tecido lesado e à capacidade de, por quimiotaxia, atraírem outras células indiferenciadas do organismo receptor ao local onde está a ocorrer a regeneração tissular (Requicha *et al.*, 2016). Além disso, dado serem células imunoprivilegiadas, não despoletam reacção de rejeição pelo organismo e têm um efeito imunomodulatório muito benéfico no tratamento de doenças inflamatórias e com componente imunomediado, sendo uma alternativa útil aos tratamentos prolongados com glucocorticoides e outros imunossuppressores (Requicha *et al.*, 2016).

Em suma, o PRP apresenta aplicabilidade terapêutica em diferentes espécies animais, resultando numa redução dos sinais clínicos associada a lesões osteoarticulares.

No fim do tratamento, a avaliação clínica dos cães evidenciou que não havia nenhum sinal de dor articular ou crepitação nas articulações tratadas, bem como ausência de claudicação. Os resultados animadores do presente trabalho indicam a necessidade de estudos mais abrangentes com maiores números de animais para validação do método visando a sua aplicação alogénica na rotina clínica em animais de companhia, portadores de doença articular degenerativa.

A administração alogénica de PRP demonstrou ser simples, rápido, barato e seguro para o tratamento desta enfermidade nos animais em questão. Acredita-se que o uso terapêutico deste procedimento pode trazer benefícios clínicos, os quais resultam na melhor qualidade de vida e bem-estar animal.



## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou uma resposta positiva ao tratamento alogénico com plasma rico em plaquetas no tratamento de cinco cães com osteoartrite. Acredita-se que o uso terapêutico deste procedimento pode trazer benefícios clínicos, que resultam na melhor qualidade de vida e bem-estar animal.

A terapia com PRP é uma técnica de execução simples relativamente fácil e a qualidade do produto depende da padronização da concentração de plaquetas e eliminação de vestígios de outras células como os leucócitos.

Nos casos clínicos estudados, observou-se uma redução do grau de dor e do grau de claudicação, contribuindo para o bem-estar destes animais. Verificou-se que apenas uma aplicação do PRP foi capaz de promover uma evolução positiva em animais refratário a protocolos de manejo da dor, farmacológicos e de modalidades de reabilitação.

No futuro, será de todo o interesse estudar esta terapia em populações mais numerosa de indivíduos com esta condição patológica cada vez mais prevalente devido ao aumento da esperança média de vida e da percentagem de obesidade nos animais de companhia.

Em conclusão, os resultados obtidos contribuíram para a caracterização do potencial da aplicação alogénica de PRP no tratamento da AO, demonstrando ser uma opção terapêutica e complementar a considerar na prática médico-veterinária.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abellanet, I. & Prades, M. (2009a). Intraarticular platelet rich plasma (PRP) therapy: Evaluation in 42 sport horses with OA. Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association: Guarujá, Brazil, 24-27 September. Acedido a 18 de Dezembro, 2016, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2009/72.pdf?LA=1>

Abellanet, I. & Prades, M. (2009b). *Repeated intralesional platelet rich plasma (PRP) injection evaluated in 72 sport horses with superficial flexor tendon injuries improves clinical scores and return to performance*. In Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association: Guarujá, Brazil, 24-27 September. Acedido a 18 Dezembro, 2016, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2009/102.pdf?LA=1>

Ahmad, Z., Wardale, J., Brooks, R., Henson, F., Noorani, A., Rushton, N. (2012). *Exploring the Application of Stem Cells in Tendon Repair and Regeneration*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopy and Related Surgery (pp.1018-1029).

Alves, A.G.L., Stewart, A.A., Dudhia, J., Kasashima, Y., Goodship, A.E., Smith et al. (2011). *Cell-based therapies for tendon and ligament injuries. Veterinary clinics of North America: Equine practice* (pp. 315-333).

Barbosa, A.L.T., Carlo, R.J.D., Gomes, H.C., Oliveira, A.C.D., Monteiro, B.S., Cerlo, B.N.D. (2008). *Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães*. Ciência Rural (5ªEd., pp. 1335-1340).

Bennett, D. (2010). Canine and feline osteoarthritis. In: Ettinger, S. J. & Feldman, E. C., *Textbook of veterinary internal medicine – Diseases of the dog and cat* (7ª Edição, pp. 5067-5126). Saunders Elsevier.

Black, L.L., Gaynor, J., Adams, C., Sams, A. E., Taylor, R. et al. (2008). *Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs* (pp.192-200). Vet Ther.

Brehm, W., Burk, J., Delling, U., Gittel, C., Ribitsch, I. (2012). *Stem-cell based tissue engineering in veterinary orthopaedics* (pp.677-688). *Cell & Tissue Research*.

Brown, D. C., Boston, R. C., Coyne, J. C. & Farrar, J. T. (2007). *Development and psychometric testing of an instrument designed to measure chronic pain in dogs with osteoarthritis* (pp.631-637). *Am J Vet Res*.

BSAVA Formulary (2011) Ramsey, I. *Small Animal Formulary, British Small Animal Veterinary Association* (7<sup>o</sup>Ed., pp.12, 154, 220, 350). BSAVA.

Carmona, J.U., Argüelles, D., Climent, F. & Prades, M. (2007). *Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: A preliminary pilot clinical study*. *Journal of Equine Veterinary Science* (27:4, pp. 167-170).

Clegg, P.D. (2012). *Musculoskeletal disease and injury, now and the future. Part 2: Tendon and ligament injuries*. *Equine Veterinary Journal* (pp.371-375).

Clegg, P.D., Pinchbeck, G.L. (2011). *Evidence-based medicine and stem cell therapy: How do we know such technologies are safe and efficacious*. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* (pp.373-382).

Edge-Hughes, L. (2007) *Canine treatment and rehabilitation*, In: McGowan, C., Goff, L. & Stubbs, N., *Animal Physiotherapy: Assessment, Treatment and Rehabilitation of Animals* (pp. 213-215). Blackwell Publishing.

Frank N. (2009). *Insulin Resistance and Equine Metabolic Syndrome*. In: N.E. Robinson & K.A. Sprayberry. *Current Therapy in Equine Medicine* (6<sup>a</sup> Ed., pp. 727-731). St. Louis: Saunders Elsevier.

Fortier, L.A., McCarrel, T.M., Sundman, E.A., Schnabel, L.V., Cole, B.J., Boswell, S., et al. (2011). *Biologic Therapy for Joint Disease Platelet-Rich Plasma, Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein/Autologous Condition Serum, and Bone Marrow Aspirate*. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* (San Antonio, EUA,).

Foster, T.E., Puskas, B.L., Mandelbaum, B.R., Gerhardt, M.B. & Rodeo, S.A. (2009). *Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications* ( pp.2259-2272). The American Journal of Sports Medicine. Acedido a 2 Novembro, 2016, disponível em: <http://ajs.sagepub.com/content/37/11/2259>

Fox, S. M. (2010). Pathophysiology of Osteoarthritic Pain, In: Fox, S. M., *Chronic pain in small animals* (1ªEd., pp. 74-96). Manson Publishing.

Fox, S. M. & Downing, R. (2014). Rehabilitation the Painful Patient: Pain management in physical rehabilitation, In: Millis, D. & Levine, D., *Canine rehabilitation and physical therapy* (2ªEd., pp. 243-251). Saunders Elsevier.

Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V. J. (2008). *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy* (pp.1204-1219). Circulation research.

Goldring, M.B. (2012). *Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis* (pp.7-9). Am Heart Hosp J.

Goldring, M. B. & Marcu, K. B. (2012). *Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development* (pp.109-118).Trends Mol Med.

Guercio, A., Marco, P., Casella, S., Cannella, V., Russotto, L., Purpari, G. et al. (2012). *Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints* (pp.189-194). Cell Bio Intern.

Gutierrez-Nibeyro, S. (2011). Commercial Cell-based Therapies for Musculoskeletal Injuries in Horses. *Veterinary clinics of North America: Equine practice* (pp.363-371).

Hart, B.L., Hart, L.A.,Thigpen, A.P. & Willits, N.H. (2014). Long-Term Health Effects of Neutering Dogs: Comparison of Labrador Retrievers with Golden Retrievers, PLoS ONE. Acedido em 12 de Abril de 2016 em <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0102241>

Hjelm-Björkman, A. K., Kuusela, E., Liman, A., Markkola, A., Saarto, E., Huttunen, P., et al. (2003). *Evaluation of methods for assessment of pain associated with chronic osteoarthritis in dogs* (pp.1552- 1558). JAVMA.

Hjelm-Björkman, A. K., Kapatkin, A. S. & Rita, H. J. (2011). *Reliability and validity of a visual analogue scale used by owners to measure chronic pain attributable to osteoarthritis in their dog* (pp.601-607). Am J Vet Res.

Innes, J. F. (2012). Arthritis. In: Tobias, K. M. & Johnston, S. A., *Veterinary surgery: Small animal* (pp.1078-1111). St. Louis, Missouri. Elsevier.

Jaeger, G. H. & Budsberg, S. C. (2010). Medical therapy for stifle arthritis. In: Muir, P., *Advances In The Canine Cranial Cruciate Ligament* (pp.241-245). Wiley-Blackwell.

KuKanich, B., Bidgood, T. & Knesl, O. (2012). *Clinical pharmacology of nonsteroidal anti- inflammatory drugs in dogs* (pp.69-90). Vet Anaesth Analg.

KuKanich, B. (2013). *Outpatient oral analgesics in dogs and cats beyond nonsteroidal antiinflammatory drugs: An evidence-based approach* (pp.1109-1125). Vet Clin North Am Small Anim Pract.

Lascelles, B. D. X., King, S., Roe, S. & Marcellin-Little, D. J., Jones, S. (2009). *Expression and activity of COX-1 and 2 and 5-LOX in joint tissue from dogs with naturally occurring coxofemoral joint osteoarthritis*. (pp.204-1208). J Orthop Res.

Le Blanc, K. & Pittenger, M. (2005). *Mesenchymal stem cells: progress toward promise* (pp.36-45). Cytotherapy.

Lee, K. H., Song, S.U., Hwang, T.S, Yi, I., Oh, I.S, Lee, J.Y., et al. (2001). *Regeneration of hyaline cartilage by cell- mediated gene therapy using transforming growth factor  $\beta$ 1-producing fibroblastos* (pp.1805-1813). Human Gene Therapy.

Lieberman, J. R., Daluisky A, Einhorn T.A. (2002). The role of growth factors in the repair of bone. *The journal of bone and joint surgery* (6<sup>o</sup>Ed., pp.1032-1044).

Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. (2012). *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ* (pp.1697-1707). *Arthritis rheumatol.*

Luna, N. (2007). *Células-tronco: pesquisa básica em saúde, da ética à panacéia* (pp.587-604). Interface - Comunicação, Saúde, Educação.

MacPhail, C. M. (2000). *Treatment of canine osteoarthritis* (pp.25-31). WALTHAM Focus.

Malfait, A.-M. & Schnitzer, T. J. (2013). *Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis* (pp.654-664). *Nat. Rev. Rheumatol.*

MAIA, L.; SOUZA, M. V. (2009). *Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais* (pp.1279-1286). *Ciência Rural.*

Mease, P. J., Hanna, S., Frakes, E. P. & Altman, R. D. (2011). *Pain mechanisms in osteoarthritis: Understanding the role of central pain and current approaches to its Treatment* (pp.1546-1551). *J Rheumatol.*

Millis & Levine (2014). *Assessing and Measuring Outcomes*, In: Millis, D. & Levine, D., *Canine rehabilitation and physical therapy* (2ªEd., pp.220-240). Saunders Elsevier.

Milner, P.I., Clegg, P.D., Stewart, M.C. (2011). *Stem Cell-based Therapies for Bone Repair. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* (pp. 299-314).

Mölsä, S. H., Hielm-Björkman, A. K. & Laitinen-Vapaavuori, O. M. (2013). *Use of an owner questionnaire to evaluate long-term surgical outcome and chronic pain after cranial cruciate ligament repair in dogs: 253 cases (2004-2006)*, (pp.689-695). *J Am Vet Med Assoc.*

Monteiro, B. S.; Neto, N. M. A. & Del Carlo, R. J. (2008). *Terapia celular em reparação óssea - aplicação clínica de células-tronco mesenquimais* (pp.95-100). *Ciência Veterinária nos Trópicos.*

Monteiro, B. S.; Neto, N. M. A. & Del Carlo, R. J. (2010a). *Células-tronco mesenquimais* (pp.1-8). *Ciência Rural, Santa Maria.*

Monteiro, M. V. B.; dos Santos, M. P.; Costa, C. T. C.; Whiteman, C. W. & Monteiro, F. O. B. (2010b). *Cinomose canina nos animais domésticos e silvestres.*, (pp.216-223). Revista de Ciências Agrárias.

Nixon, A.J., Watts, A.E., Schnabel, L.V. (2012). *Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration* (pp.278-294). Journal of Shoulder and Elbow Surgery Board of Trustees.

Reed, S.A, Johnson, S.E. (2012). *Refinement of Culture Conditions for Maintenance of Undifferentiated Equine Umbilical Cord Blood Stem Cells* (pp.360-366). Journal of Equine Veterinary Science.

Reichling, D. B., Green, P. G. & Levine, J. D. (2013). *The fundamental unit of pain is the cell* (pp.2-9). Pain.

Coelho, C., Bordelo, J., Dias, I., Viegas, C., Carvalho, P., Requicha, João. (2016). Utilização de sinais moleculares no tratamento da osteoartrite em medicina veterinária: estado da arte. I Jornadas de Reabilitação Veterinária e Medicina Regenerativa Veterinária. Vila Real. 10 e 11 de Setembro de 2016.

Coelho, C., Bordelo, J., Dias, I., Viegas, C., Carvalho, P., Requicha, João. (2016). Terapias à base de células estaminais em osteoartrite: estado da arte. I Jornadas de Reabilitação Veterinária e Medicina Regenerativa Veterinária. Vila Real. 10 e 11 de Setembro de 2016.

Ribitsch, I., Burk, J., Delling, U., Geißler, C., Gittel, C., Jülke, H., et al. (2010). *Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine*. In: Scheper, T., Belkin, S., Doran, P. M., Endo, I., Gu, M.B., Hu, W.S., Mattiasson, B., Nielsen, J., Stephanopoulos, G.N., Ulber, R., Zeng, A.-P., Zhong, J.-J., Zhou, W. (Eds.), *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (pp.219-263). Springer.

Schaible, H-G. (2012). *Mechanisms of Chronic Pain in Osteoarthritis* (14<sup>o</sup>Ed., pp.549-556). Curr Rheumatol Rep.

SCHIMIDT, M. B; CHEN, E. H; LYNCH, S. E. (2006). *A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair* (pp. 403-412). Osteoarthritis and Cartilage.

Schulz, K. (2007). Diseases of the Joints. In: Fossum, T. W., *Small animals surgery* (3ªEd., pp.1155-1158). Mosby Elsevier.

Seo, J., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka H., Tabata, Y., et al. (2012). *Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatina/β-tricalcium phosphate sponges* (pp.1481-1486). Research in Veterinary Science.

Sharma, J. N. & Jawad, N. M. (2005). Adverse effects of COX-2 inhibitors (5ª Ed., pp.629-645). Scientific World Journal.

Singh, P. & Williams, D. J. (2008). *Cell therapies: realizing the potential of this new dimension to medical therapeutics* (pp. 307- 319). Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.

Sutter, W. W., Kaneps, A. J., & Bertone, A. L. (2004). *Comparison of hematologic values and transforming growth factor-β and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood* (pp. 924-930). Am J Vet Res.

Sutter, W. (2007). Clinical techniques in equine practice. *Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries* (pp.198-208). Am J Vet Res.

Taylor, S. M. (2009). Disorders of the Joints. In: Nelson, R. W. & Couto, C. G., *Small animal internal medicine* (4ªEd., pp. 1127-1128). Mosby Elsevier.

Towell, T. L. (2010). Nutrition-Related Skeletal Disorders. In: Ettinger, S. J. & Feldman, E. C., *Textbook Of Veterinary Internal Medicine*, (7ªEd., pp. 291-299). Saunders Elsevier.

Vlad, S.C., Neogi, T., Aliabadi, P., Fontes, J. D. & Felson, D. T. (2011). *No association between markers of inflammation and osteoarthritis of the hands and knees* (pp.70-1665). J Rheumatol.



Empresa Sorisa S.A. (2017). Equipamento de diatermia resistiva e capacitiva - I-TECH.AR. Acedido a 2 de Maio, 2017, disponível em: [http://www.sorisa.pt/wp-content/uploads/2016/01/FP-I-TECH.AR\\_.pdf](http://www.sorisa.pt/wp-content/uploads/2016/01/FP-I-TECH.AR_.pdf)

Yamada, A. L. M., Carvalho, A.M., Oliveira, P.G.G., Felisbino, S.L., Queiroz, M.J., Watanabe, M.J., et al. (2012). *Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica* (pp. 318-322). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Zhang, R.-X., Ren, K. & Dubner, R. (2013). *Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models* (pp.1308-1315). Osteoarthritis Cartilage.